

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

**ALTERACIONES METABÓLICAS ASOCIADAS A LA SOBREEXPRESIÓN
HEPÁTICA DE UCP2, EN RATONES TRANSGÉNICOS Y EN HEPATOCITOS
CULTIVADOS DE RATA**

TESIS DOCTORAL

CARMEN. VANESA DÍAZ GARCÍA

Madrid, 2012

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

ALTERACIONES METABÓLICAS ASOCIADAS A LA SOBREENPRESIÓN HEPÁTICA
DE UCP2, EN RATONES TRANSGÉNICOS Y EN HEPATOCITOS
CULTIVADOS DE RATA

Trabajo presentado por Carmen Vanesa Díaz García, Licenciada en Bioquímica, para optar al grado de Doctor.

Director: Dr. Juan Emilio Felú Albiñana

Trabajo realizado en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid.



Facultad de Medicina
Ciudad Real

*Decano-Comisario
Juan E. Felú*

JUAN EMILIO FELÚ ALBIÑANA, Catedrático de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Medicina de Ciudad Real, de la Universidad de Castilla-La Mancha.

CERTIFICA:

Que CARMEN VANESA DÍAZ GARCÍA, Licenciada en Bioquímica por la Universidad Autónoma de Madrid, realizó bajo su dirección, en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid, el trabajo titulado “Alteraciones metabólicas asociadas a la sobreexpresión hepática de UCP2, en ratones transgénicos y en hepatocitos cultivados de rata”, que presenta como tesis doctoral.

Madrid, 19 de Abril 2012

Fdo: Juan Emilio Felú Albiñana
Director de tesis

Fdo. Antonio Sillero Repullo
Tutor de tesis

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero dar las gracias al Prof. Juan Emilio Felfú, que me ha ayudado a lo largo de estos años a desarrollar mi labor investigadora. Su confianza, su apoyo constante y su interés en mi formación científica han sido muy importantes para mí. He de agradecerle especialmente su labor como director de esta tesis.

Agradecer al Centro de Biotecnología Animal y Terapia Génica que dirige la Dra. Fatima Bosch la ayuda prestada en la obtención de los animales transgénicos.

También quiero agradecer a mis compañeros del B11, M^a Carmen, María, Begoña, Andrés y Belén por haber sido para mi como mi segunda familia todos aquellos años, por haberme ayudado al desarrollo experimental y haberme apoyado tanto en lo personal como en lo profesional cuando tanto lo necesitaba.

Al Dr. Jose Gonzalez Castaño, Bea, Ana, Fernando y Marta por haberme acogido en su laboratorio y haberme echo sentir como en casa desde el primer día.

A mi amiga Pili por haberme escuchado siempre que lo necesitaba, por sus múltiples consejos y por su compañía en esos largos viajes de metro.

A mis actuales compañeros del Hospital 12 de Octubre, Teresa, Alba, Carlos, Analía y Jose Antonio por haber estado siempre animándome a la lectura de esta tesis además de por ser unas personas estupendas.

A las chicas de Reumatología del Hospital 12 de Octubre, por haberme prestado su tiempo cuando lo necesité y haber compartido esos buenos ratos en la salita del café.

Por encima de todo, quiero dedicar esta tesis y dar las gracias a mis padres, Martín y M^a Carmen por haber estado ahí para cualquier cosa que necesitara, apoyándome tanto personal como profesionalmente.

A mi hermana M^a Elena, por ser además de una fantástica hermana una gran amiga. Con especial cariño a Rocío, por ser una gran confidente y amiga además de mi tía preferida.

A Raúl por haberme acompañado esta última década de mi vida y haber estado a mi lado en los buenos y no tan buenos momentos.

Al pequeño gran Jorge que nació con el inicio de esta tesis, y que sin darme cuenta ya se ha hecho todo un hombrecito. Y por último a Jaime, el pequeñín de la familia.

Por todo esto y mucho más muchísimas gracias a todos.

RESUMEN

La proteína desacoplante 2 (UCP2) pertenece a una familia de proteínas integrales de la membrana interna mitocondrial, implicadas en el transporte de protones, en el control del metabolismo energético y en la respuesta al estrés oxidativo.

En la primera parte de este trabajo hemos estudiado la caracterización de ratones transgénicos que sobreexpresan UCP2 en hígado. Así, en el hígado de estos animales se observó un aumento del contenido de mRNA y de proteína UCP2. También en mitocondrias aisladas de estos ratones se detectó un aumento (38%) en el consumo de O₂ y una disminución (35%) en el potencial de membrana en comparación con los valores observados en mitocondrias aisladas de ratones controles. Asimismo, los niveles hepáticos de ATP disminuyeron en ratones transgénicos ayunados 24-48 horas respecto de ratones controles (48h 1.03 ± 0.17 vs 1.75 ± 0.15 $\mu\text{mol/g}$ de tejido; $p < 0.05$). Por otro lado, no se observaron diferencias significativas en la ganancia de peso ni en las pruebas de tolerancia a glucosa o insulina entre ratones controles y transgénicos.

Nuestro siguiente paso ha sido estudiar si estos animales eran más resistentes a la acción diabetogénica de la dieta alta en lípidos. Por ello, se hizo un estudio a lo largo de 3 meses de la ganancia de peso en ratones transgénicos y controles observándose que en los ratones transgénicos alimentados con dieta alta en lípidos los incrementos de peso son menores que en los ratones control. También se estudiaron los niveles de mRNA y de proteína UCP2 en ratones controles y transgénicos sometidos a la dieta alta en lípidos no viéndose diferencias significativas respecto a los controles y transgénicos alimentados con dieta normal. Por último, en las curvas de tolerancia a la glucosa y a la insulina se observó una mejor respuesta a la sobrecarga de glucosa y una mayor sensibilidad a la acción de la insulina en los animales transgénicos alimentados con una dieta alta en lípidos lo cual sugiere que la sobreexpresión del gen UCP2 en el hígado de ratones transgénicos provoca una menor intolerancia a la glucosa y una menor resistencia a la insulina en respuesta a una dieta alta en lípidos. Al mismo tiempo, niveles de insulina y glucemia basal inferiores en los animales transgénicos alimentados con dieta alta en lípidos confirman que la sobreexpresión del gen UCP2 en el hígado de ratones transgénicos disminuye la resistencia a la insulina provocada por una dieta alta en lípidos.

En la última parte del trabajo desarrollamos un modelo celular de sobreexpresión del gen hUCP2. Para ello se realizaron infecciones de hepatocitos en cultivo primario con

adenovirus portadores del gen β gal (AdBgal) y adenovirus portadores del gen UCP2 (AdUCP2). Una vez demostrada la expresión de la proteína UCP2 en los hepatocitos analizamos su funcionalidad. Así, en mitocondrias aisladas de hepatocitos infectados con AdUCP2 aumenta el consumo de O_2 (54%), disminuye el potencial de membrana (87%) y los niveles hepáticos de ATP (26%) en comparación con los valores observados en mitocondrias aisladas de hepatocitos infectados con Ad β gal.

A continuación estudiamos la influencia que sobre el metabolismo de hidratos de carbono pudiera tener la sobreexpresión del gen de UCP2, en cultivos primarios de hepatocitos de rata.

Así hemos demostrado que la sobreexpresión de UCP2 altera el metabolismo de hidratos de carbono en cultivo primario de hepatocitos aumentando la oxidación de glucosa con un incremento en la producción de CO_2 (79%) y una disminución en la producción de lactato (51%). Asimismo, se reduce el flujo gluconeogénico disminuyendo la producción de glucosa (71,6%) a partir de lactato/piruvato, en relación a los hepatocitos infectados con β gal.

SUMMARY

The uncoupling protein 2 (UCP2) belongs to a family of integral proteins of the internal mitochondrial membrane implicated in proton transport, in the control of the energetic metabolism and response to oxidative stress.

The first part of this work, we have studied the characterization of transgenic mice that overexpressed the gene UCP2 in the liver. In these animals, higher hepatic levels of both UCP2 mRNA and protein were observed. Furthermore, a significant increase (38%) in the rate of O₂ consumption and a marked decrease (35%) in membrane potential, were observed in hepatic mitochondrias isolated from transgenic mice as compared to those found in control animals. In connection with this, the hepatic content of ATP was significantly reduced in 24-48 hour fasted transgenic mice, as compared to control animals (48 hour: 1.03 ± 0.17 vs 1.75 ± 0.15 $\mu\text{mol/g}$; $p < 0.05$).

On the other hand, no significant differences in weight gain or in the glucose tolerance tests or insulin were observed between control and transgenic mice.

After this we have studied whether these animals were more resistant to diabetogenic action of the high fat diet. Therefore, a study of weight gain was conducted over 3 months in transgenic mice and controls. In transgenic mice fed with high fat diet weight gain are lower than in control mice. Also we studied the levels of mRNA and protein UCP2 in controls and transgenic mice fed with high fat diet but we don't see significant differences compare to control and transgenic fed with standard diet. Finally, transgenic animals fed a high fat diet showed a better response to glucose load an increased sensitivity to insulin in the curves of glucose tolerance and insulin, which suggests that the UCP2 gene overexpression in the liver of transgenic mice results in reduced glucose intolerance and insulin resistance in response to high fat diet.

At the same time, insulin and glucose levels lower in transgenic animals fed high fat diet confirm that overexpression of UCP2 gene in the liver of transgenic mice decreases insulin resistance caused by a high fat diet.

In the last part of this work we developed a cellular model that overexpressed the gene hUCP2 gene. This involve infection of hepatocytes in primary culture with adenovirus carrying the gene βgal (AdBgal) and adenovirus carrying the gene UCP2 (AdUCP2). Having demonstrated the UCP2 protein expression in hepatocytes we analyze its functionality. Thus, in mitochondrias isolated from hepatocytes infected with AdUCP2 O₂ consumption increases (54%), the membrane potential (87%) and hepatic ATP levels (26%) decreases compared with values observed in mitochondria isolated from hepatocytes infected with Ad βgal . After this we study the influence UCP2 gene

overexpression on the metabolism of carbohydrates in primary cultures of rat hepatocytes.

Thus we have demonstrated that UCP2 overexpression alters the metabolism of carbohydrates in primary cultures of rat hepatocytes increased glucose oxidation with an increase in CO₂ production (79%) and a decrease in lactate production (51%). It also reduces the flow gluconeogenic decreasing glucose production (71.6%) from lactate / pyruvate compare to hepatocytes infected with Adβgal.

INDICE

ABREVIATURAS	12
1 INTRODUCCIÓN.....	15
1.1 CADENA RESPIRATORIA Y FOSFORILACIÓN OXIDATIVA.....	15
1.1.1 Sistemas de transporte electrónico mitocondrial	15
1.1.2 La fosforilación oxidativa.....	16
1.1.3 Proceso de desacoplamiento.....	17
1.2 PROTEÍNAS DESACOPLANTES	17
1.2.1 La proteína desacoplante 1 (UCP1).....	18
1.2.2 Proteína desacoplante 2 (UCP2)	21
1.2.3 Proteína desacoplante 3 (UCP3)	23
1.2.4 Otros análogos de UCPs	25
1.3 ASPECTOS FISIOPATOLÓGICOS DE LAS UCPs	27
1.3.1 Relación de las UCPs con el metabolismo basal.....	27
1.3.2 Relación de las UCPs con el metabolismo lipídico, la obesidad y la diabetes.....	29
2 OBJETIVOS	33
3 MATERIALES Y MÉTODOS	35
3.1 APARATOS.....	35
3.2 REACTIVOS.....	36
3.3 ANIMALES	37
3.4 OBTENCIÓN DE RATONES TRANSGÉNICOS.....	38
3.5 CULTIVO PRIMARIO DE HEPATOCITOS	38
3.5.1 Obtención de hepatocitos	38
3.5.1.1 Sistema de perfusión	38
3.5.1.2 Medio de perfusión.....	39
3.5.1.3 Procedimiento quirúrgico	40
3.5.1.4 Aislamiento de los hepatocitos.....	40
3.5.1.5 Viabilidad de los hepatocitos.....	42
3.5.1.6 Cultivo y procesamiento de los hepatocitos cultivados	42
3.6 INFECCIÓN DE LOS HEPATOCITOS EN CULTIVO PRIMARIO CON VECTORES ADENOVIRALES	43
3.6.1 Determinación de la multiplicidad de infección óptima	43

3.6.2	Procedimiento de infección de los hepatocitos de rata en cultivo primario	44
3.7	ANÁLISIS DEL DNA POR LA TÉCNICA DE “SOUTHERN BLOT”	45
3.8	ANÁLISIS DE LOS NIVELES DE RNA MENSAJERO POR LA TÉCNICA DE “NORTHERN BLOT”	46
3.9	DETECCIÓN DE PROTEÍNAS POR LA TÉCNICA DE “WESTERN BLOT” ..	47
3.10	AISLAMIENTO DE MITOCONDRIAS	48
3.11	MEDIDA DEL CONSUMO DE O ₂ Y DEL POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL.....	49
3.12	CURVA DE TOLERANCIA A LA GLUCOSA	50
3.13	CURVA DE TOLERANCIA A LA INSULINA	50
3.14	DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS SÉRICOS.....	50
3.14.1	Glucosa	51
3.14.2	Triglicéridos.....	51
3.14.3	Ácidos grasos no esterificados (NEFAs).....	52
3.14.4	Colesterol	52
3.14.5	Insulina.....	53
3.15	VALORACIÓN DE METABOLITOS	53
3.15.1	Nucleótidos de adenina.....	53
3.15.2	Lactato	55
3.15.3	Formación de ¹⁴ CO ₂	55
3.15.4	Glucógeno.....	56
3.16	ENSAYO DE LA GLUCONEOGÉNESIS EN HEPATOCITOS EN CULTIVO PRIMARIO	57
3.17	VALORACIÓN DE PROTEÍNAS	58
3.18	ESTUDIO ESTADÍSTICO	58
4	RESULTADOS	60
4.1	DESARROLLO DE UN MODELO DE RATÓN TRANSGÉNICO QUE SOBREEEXPRESA EL GEN UCP2 EN HÍGADO.....	60
4.2	ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN HEPÁTICA Y FUNCIONALIDAD DE LA PROTEÍNA UCP2	63
4.3	ALTERACIONES METABÓLICAS ASOCIADAS A LA SOBREEXPRESIÓN HEPÁTICA DE UCP2.....	70
4.4	RESPUESTA DE LOS ANIMALES TRANSGÉNICOS A UNA DIETA ALTA EN LÍPIDOS	73

4.4.1	Evolución del peso corporal en ratones controles y transgénicos alimentados con dieta alta en lípidos	74
4.4.2	Curvas de tolerancia a la glucosa e insulina en ratones controles y transgénicos alimentados con dieta alta en lípidos	75
4.4.3	Niveles séricos de diferentes metabolitos en ratones controles y transgénicos alimentados con dieta rica en lípidos	80
4.4.4	Análisis de la sobreexpresión del gen UCP2 en ratones controles y transgénicos alimentados con dieta alta en lípidos	81
4.5	SOBREEXPRESIÓN DEL GEN hUCP2 EN HEPATOCITOS DE RATA EN CULTIVO PRIMARIO	85
4.5.1	Análisis de la expresión del mRNA y de la proteína del gen hUCP2 en hepatocitos de rata en cultivo primario	85
4.5.2	Análisis de la funcionalidad de la proteína hUCP2 expresada en hepatocitos de rata en cultivo primario	88
4.5.3	Niveles de nucleótidos de adenina en hepatocitos de rata en cultivo primario que expresan hUCP2	92
4.5.4	Estudio del metabolismo de la glucosa en hepatocitos de rata en cultivo primario que expresan hUCP2	93
5	DISCUSIÓN	98
5.1	Fenotipo metabólico del ratón transgénico que sobreexpresa hUCP2 en hígado	98
5.2	Influencia de la dieta sobre el fenotipo metabólico del ratón transgénico que sobreexpresa hUCP2 en hígado	102
5.3	Modelo celular de sobreexpresión de hUCP2 en hepatocitos de rata en cultivo primario	107
6	CONCLUSIONES	113
7	BIBLIOGRAFÍA	116

ABREVIATURAS

ADP:	adenosina 5'-difosfato
AMP:	adenosina 5'-monofosfato
AMPC:	adenosina 3':5'-monofosfato cíclico
ATP:	adenosina 5'-trifosfato.
BSA:	albúmina sérica bovina
cDNA:	ácido desoxirribonucleico complementario
dCTP:	deoxicitidina trifosfato
DNA:	ácido desoxirribonucleico
EDTA:	ácido etilendiaminotetraacético
EGTA:	ácido etilenglicol-bis-(β-aminoetil éter) N, N'-tetraacético.
EEM:	error estándar de la media
EROs:	especies reactivas de oxígeno
FADH ₂ :	flavina adenina dinucleótido reducido
FCPP:	carbonilcianuro-p-trifluorometoxifenilhidrazona
GDP:	guanosina 5'-difosfato
GTP:	guanosina 5'-trifosfato
G-6-P:	glucosa 6-fosfato
G6PDH:	glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (D-glucosa 6-fosfato:NADP oxidorreductasa, EC 1.1.1.49)
MOPS:	ácido 3-(N-morfolino) propanosulfónico
NADH:	nicotinamida adenina dinucleótido reducido
NEFAs:	ácidos grasos no esterificados
PBS:	solución salina con tampón fosfato
PEPCK:	fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (GTP:oxalacetato carboxi-liasa, EC 4.1.1.32)
Pi:	fosfato inorgánico
PVDF:	difluoruro de polivinilideno
RNA:	ácido ribonucleico
RNA _m :	ácido ribonucleico mensajero
rpm:	revoluciones por minuto
SDS:	dodecilsulfato sódico
SSC:	solución salina con citrato de sodio
TAB:	tejido adiposo blanco

TAM: tejido adiposo marrón

T₃: triiodotironina

TNF α : factor de necrosis tumoral *alpha*

n: número de experimentos

INTRODUCCIÓN

1 INTRODUCCIÓN

1.1 CADENA RESPIRATORIA Y FOSFORILACIÓN OXIDATIVA

En los organismos eucariotas, la **mitocondria** es la organela subcelular especializada en la obtención de energía química en forma de ATP, en condiciones aerobias. La presencia en estos orgánulos de un complejo sistema enzimático, la **cadena respiratoria**, permite la oxidación total de las moléculas orgánicas combustibles (**respiración celular**). La energía se conserva en forma de gradiente electroquímico de protones para ser posteriormente utilizada en la síntesis de ATP, en un proceso denominado **fosforilación oxidativa**.

1.1.1 Sistemas de transporte electrónico mitocondrial

La cadena respiratoria está formada por cinco complejos multiproteicos, todos ellos situados en la membrana mitocondrial interna (**Figura 1**), que son los siguientes:

Complejo I o NADH deshidrogenasa

Complejo II o succinato deshidrogenasa

Complejo III o citocromo reductasa

Complejo IV o citocromo oxidasa

Complejo V o F_0F_1 -ATP sintetasa (ATPasa)

El **complejo I** cataliza la transferencia de electrones desde el NADH generado hacia el **coenzima Q o ubiquinona**. Este flujo de electrones provoca la transferencia de protones hacia el espacio intermembranoso de la mitocondria. La ubiquinona es también el aceptor de los electrones que proceden de la oxidación del succinato por el complejo II o succinato deshidrogenasa. Sin embargo, en este caso no se genera ningún flujo de protones hacia el exterior de la matriz mitocondrial como ocurría anteriormente (Krauss et al. 2005; Nubel and Ricquier 2006).

La ubiquinona reducida cede los electrones al **complejo III** que a su vez los transfiere al citocromo c, generándose de nuevo un flujo de protones hacia el espacio intermembranoso. La tercera bomba de protones es el **complejo IV** que oxida el citocromo c y cede los electrones al O_2 para formar H_2O .

Los complejos I a IV aprovechan la energía derivada del transporte de electrones desde el NADH y el $FADH_2$ hasta el O_2 para generar un gradiente electroquímico de protones entre la matriz mitocondrial y el espacio intermembranoso. La energía potencial acumulada en este gradiente electroquímico es utilizada por el **complejo V** o

F₀F₁- ATP sintetasa para sintetizar ATP a partir de ADP y Pi. (Dimroth et al. 2000; von Ballmoos et al. 2009).

Para el correcto funcionamiento de la fosforilación oxidativa son necesarias además otras proteínas. De hecho, el **transportador mitocondrial de Pi** y la **translocasa de ATP/ADP** (transportador de nucleótidos de adenina o ANT) son considerados parte del sistema. El primero de ellos actúa cotransportando fosfato y protones hacia la matriz mitocondrial, pero también puede actuar como un sistema antiportador de Pi y OH⁻. El segundo actúa a modo de intercambiador de ADP citosólico por ATP sintetizado en la matriz mitocondrial, que es transportado al citosol (Klingenberg 2008).

De la misma manera, las proteínas desacopladoras o UCPs, deben ser consideradas también parte del sistema que lleva a cabo la fosforilación oxidativa, al ser responsables de su desacoplamiento con el fin de disipar energía en forma de calor en condiciones fisiológicas o patológicas (Nubel and Ricquier 2006).

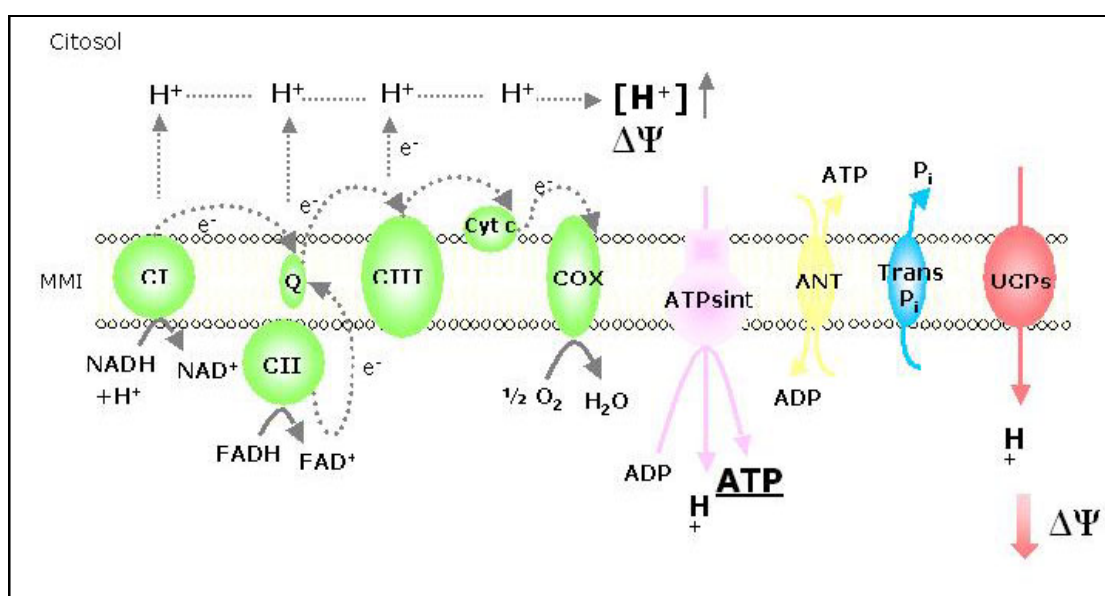


Figura 1.- Esquema representativo de los complejos proteicos que componen el sistema de la fosforilación oxidativa y de otras proteínas asociadas: complejos I al V (NADH deshidrogenasa, succinato deshidrogenasa, citocromo reductasa, citocromo oxidasa y ATP sintetasa), translocasa de ADP/ATP (ANT), transportador de Pi y proteínas desacopladoras (UCPs).

1.1.2 La fosforilación oxidativa

El mecanismo mediante el cual la energía liberada en la respiración se utiliza para impulsar la síntesis de ATP se basa en el acoplamiento quimiosmótico, propuesto

en 1961 por el bioquímico británico Peter Mitchell (Mitchell 1979). Este modelo propone que la energía del transporte electrónico de la membrana interna mitocondrial impulsa un sistema de transporte activo, que transfiere protones fuera de la matriz mitocondrial al espacio intermembranoso. Esta acción genera un gradiente electroquímico de protones, con un valor de pH más bajo fuera de la membrana mitocondrial interna que dentro en la matriz mitocondrial. Los protones del exterior tienen termodinámicamente tendencia a volver a entrar al interior de la matriz mitocondrial, para igualar el pH a ambos lados de la membrana. Así pues, el bombeo de protones al exterior por los complejos de la cadena respiratoria da lugar a la conversión de la energía de oxido-reducción en energía quimio-osmótica, en forma de un gradiente electroquímico. La energía liberada por la descarga de este gradiente, al penetrar de nuevo los protones al interior de la matriz mitocondrial, puede acoplarse con la fosforilación de ADP a ATP, con lo que no se forman intermediarios aislables. En este proceso interviene el complejo F_0F_1 (Complejo V). La porción F_0 del complejo se extiende a través de la membrana interna y contiene un canal específico para la vuelta de los protones a la matriz mitocondrial. La energía libre que se libera cuando los protones pasan por este canal para regresar a la matriz se aprovecha para impulsar la síntesis de ATP, catalizada por el componente F_1 del complejo (Boyer 1997; Fillingame et al. 2000).

1.1.3 Proceso de desacoplamiento

En la mayoría de tipos celulares, el acoplamiento entre la cadena respiratoria y la fosforilación oxidativa es imperfecto, produciéndose una cierta reentrada de protones a través de la membrana mitocondrial interna hacia la matriz mitocondrial, sin que tenga lugar síntesis de ATP. En el hígado o en el músculo esquelético, este fenómeno representa un 20-30% (Brand et al. 1994) del consumo de oxígeno total de estos tejidos, indicando que ciertos componentes de la membrana mitocondrial interna serían los responsables de esta “reentrada de protones” (Echtay 2007).

1.2 PROTEÍNAS DESACOPLANTES

Las proteínas desacoplantes (UCPs) son proteínas capaces de desacoplar la fosforilación oxidativa mitocondrial, participando en el control de la termogénesis al permitir la disipación de energía en forma de calor. Hasta el año 1997, únicamente se

conocía la existencia de una proteína desacoplante específica de tejido adiposo marrón, la UCP1. Posteriormente se han clonado a partir de librerías de cDNA varias proteínas desacoplates con una alta homología con la UCP1, como la UCP2, UCP3, AtUCP, StUCP, BMCP1 y UCP4 (Ricquier and Bouillaud 2000).

Estas proteínas desacoplates poseen en su secuencia de aminoácidos un dominio característico de los transportadores mitocondriales, consistente en una estructura en la que existen tres regiones homólogas internas (o intramembrana) de unos 100 aminoácidos cada una (Klingenberg and Huang 1999). En cada región existen 2 dominios transmembrana en forma de α -hélice (separados por unos 40 aminoácidos) y los extremos N- y C-terminal localizados en el espacio intermembranoso mitocondrial (Echtay 2007) (**Figura 2**). A pesar de que no existe un conocimiento de la estructura molecular de las proteínas desacoplates homólogas tan profundo como el de la UCP1, sí se sabe que las proteínas homólogas conservan los seis dominios transmembrana, salvo en el caso de la UCP3S. En humanos, existe una diferencia importante entre la UCP3 y las otras dos proteínas desacoplates, ya que existen dos isoformas (L y S; “long” y “short”) de la misma proteína.

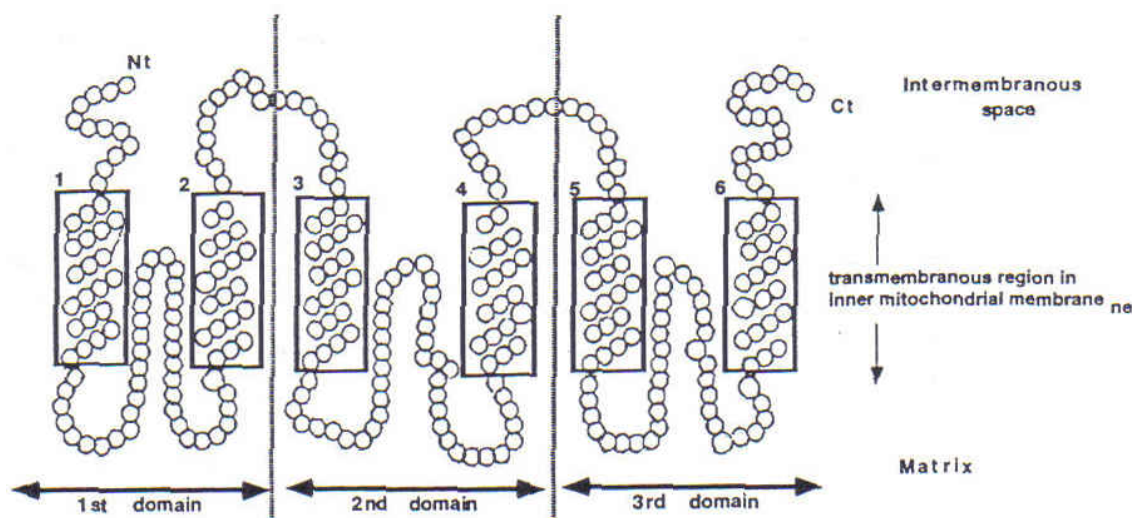


Figura 2.- Modelo estructural genérico de las UCPs.

1.2.1 La proteína desacoplante 1 (UCP1)

Ya en 1972, una serie de estudios pusieron de manifiesto la baja eficiencia energética de las mitocondrias de los adipocitos marrones, debido al desacoplamiento entre la cadena respiratoria y la fosforilación oxidativa (Nicholls et al. 1972).

Se propuso la existencia de una proteína localizada en la membrana mitocondrial interna, responsable de este fenómeno y cuya capacidad desacoplante se inhibía en

presencia de nucleótidos purínicos y se estimulaba en presencia de ácidos grasos (Nicholls 1976). Experimentos posteriores permitieron identificar esta proteína de aproximadamente 32 kDa, purificarla de hámster, rata y hombre (Lin and Klingenberg 1980; Ricquier et al. 1982; Cassard et al. 1990), secuenciarla (Aquila et al. 1985), clonarla (Bouillaud et al. 1985; Jacobsson et al. 1985) y reproducir su actividad desacoplante en liposomas (Klingenberg and Winkler 1985; Jezek et al. 1990). Se estableció claramente que era la proteína responsable del desacoplamiento que ocurría en las mitocondrias de los adipocitos marrones y se denominó termogenina o UCP (“uncoupling protein” o proteína desacoplante). El posterior hallazgo en varios tejidos de proteínas desacoplantes homólogas hizo que esta proteína se renombrase como UCP1.

El gen de la proteína UCP1 es de copia única. Su organización genómica se conoce en el caso de la rata, el ratón y el hombre, y se halla localizado en los cromosomas 19, 8 y 4 de estos seres vivos, respectivamente. Consiste en seis exones y cinco intrones, codificando cada exón para un dominio transmembrana (Ricquier and Bouillaud 2000).

La regulación de la expresión del gen UCP1 es específica de tejido. La UCP1 constituye un marcador inequívoco del adipocito marrón que lo diferencia –entre otros parámetros- del adipocito blanco. Su región promotora ha sido extensivamente estudiada, intentando dilucidar los mecanismos que hacen que esta proteína se exprese en gran cantidad en el tejido adiposo marrón (TAM), así como las regiones implicadas en su regulación en respuesta a ciertos estímulos fisiológicos. (Ricquier and Bouillaud 2000).

En el promotor del gen UCP1 de rata se pueden distinguir dos zonas claramente diferenciadas: un enhancer distal, también identificado en ratón (Kozak et al. 1994) y en humano (Del Mar Gonzalez-Barroso et al. 2000) y una región proximal. En la primera situada entre las posiciones -2494/-2319 se han definido elementos de respuesta a PPAR, a ácido retinoico y a la hormona tiroidea (Cassard-Doulcier et al. 1994; Rabelo et al. 1995; Larose et al. 1996; Rabelo et al. 1996; Sears et al. 1996). Asimismo, esta región es importante para la expresión tejido específica del gen (Boyer and Kozak 1991; Cassard-Doulcier et al. 1993; Cassard-Doulcier et al. 1998).

La zona proximal del promotor, contiene dos elementos de unión a C/EBP y un elemento de respuesta a cAMP donde se une CREB; este factor de transcripción también participa en el control de la expresión basal del gen, ligada a la diferenciación de adipocito marrón (Yubero et al. 1994; Yubero et al. 1994; Yubero et al. 1998).

La proteína UCP1 es una proteína de 32 kDa que homodimeriza. Se han descrito tres residuos de arginina situados en las hélices transmembrana, así como una región de siete aminoácidos situada entre los aminoácidos 261-269, importantes para la unión de nucleótidos (Ricquier and Bouillaud 2000). Mutaciones en las argininas (Modriansky et al. 1997) o en la secuencia de siete aminoácidos antes mencionada (Bouillaud et al. 1994), suprimen la inhibición de UCP1 por nucleótidos.

En condiciones fisiológicas en las que la producción de calor no es necesaria, UCP1 está inhibida por nucleótidos de purina (GTP, ATP, ADP y GDP). Por el contrario cuando se requiere producción de calor, la estimulación de los adipocitos marrones por norepinefrina acelera la lipólisis provocando un aumento de los ácidos grasos libres, que a su vez activan la UCP1 por un mecanismo no claramente establecido (Nedergaard et al. 2001; Rial and Gonzalez-Barroso 2001; Echtay 2007; Wolf 2009).

La activación de la UCP1 promueve la reentrada de protones en la matriz mitocondrial, descendiendo el potencial de membrana mitocondrial y aumentando la velocidad de la respiración, de tal modo que la respiración deja de estar acoplada a la fosforilación de ADP. En estas condiciones, la mayor parte de la energía de la oxidación se disipa en forma de calor (Ricquier et al. 1991; Watanabe et al. 2008).

La UCP1 no está presente de modo exclusivo en la membrana interna de las mitocondrias de los adipocitos marrones (Miroux et al. 1993), también se expresa en el músculo liso del tracto digestivo, útero y aparato reproductor masculino (Nibbelink et al. 2001). Además, también se ha detectado en el timo de ratas y ratones (Carroll et al. 2005; Adams et al. 2008; Adams et al. 2008) y en piel (Mori et al. 2008).

El papel esencial de la UCP1 en la termogénesis inducida por el frío fue claramente demostrado al observar que ratones deficientes en el gen UCP1 presentaban un comportamiento normal a 25 °C, pero eran incapaces de mantener su temperatura en ambiente frío (4 °C) y morían de hipotermia (Enerback et al. 1997).

Por otra parte, la expresión ectópica de UCP1 en mitocondrias de células de mamífero, en levaduras o en animales transgénicos provoca un desacoplamiento de la fosforilación oxidativa que puede ser activado por ácidos grasos libres e inhibido por ATP o GDP (Garlid et al. 1998; Li et al. 2000; Klingenberg and Echtay 2001; Couplan et al. 2002).

Además, estudios *in vivo* e *in vitro* han mostrado que la biosíntesis de UCP1 está fuertemente regulada a nivel de transcripción. Los agonistas β adrenérgicos, la T_3 , la leptina, los ácidos grasos, el ácido retinoico, las tiazolidindionas y el $TNF\alpha$ estimulan la

expresión de UCP1, mientras que los glucocorticoides la inhiben (Boss et al. 2000; Ricquier and Bouillaud 2000; Soumano et al. 2000; Lanni et al. 2003; Tomas et al. 2004).

1.2.2 Proteína desacoplante 2 (UCP2)

Pese a que la UCP1 es altamente selectiva en tejido adiposo marrón (TAM), se observó que el desacoplamiento o la pérdida de protones a través de la membrana mitocondrial interna no era un fenómeno exclusivo de este tejido adiposo marrón, sino que en tejidos como el músculo o en órganos como el hígado se producía un fenómeno similar, que era responsable de un 20 a un 30% del consumo de oxígeno total de estos tejidos (Brown 1992). Así, en 1997 se descubrió la UCP2 (32Kda), cuya homología con la UCP1 es del 57% en el caso de la rata y del 59% en su variante humana (Fleury et al. 1997; Gimeno et al. 1997). Su distribución tisular es mucho más amplia, ya que a diferencia de la UCP1, el mRNA de UCP2 ha sido identificado por Northern Blot también en tejido adiposo blanco (TAB), músculo esquelético, corazón, pulmón, páncreas, riñón, intestino, placenta, cerebro, tejido linfoide e hígado (Ricquier 1999; Ricquier and Bouillaud 2000). En el hígado son las células no parenquimatosas y las de Kuppfer las que expresan cantidades significativas de mRNA de UCP2, en condiciones normales. (Larrouy et al. 1997). Sin embargo, se ha detectado expresión de mRNA de UCP2 en hepatocitos tratados con lipopolisacárido bacteriano o ácidos grasos libres (Cortez-Pinto et al. 1998; Cortez-Pinto et al. 1999; Ruzicka et al. 2005).

El gen UCP2, compuesto por ocho exones y siete intrones, está localizado en el cromosoma 7 de ratón, en el cromosoma 11 humano (Fleury et al. 1997; Gong et al. 1997; Solanes et al. 1997) y en el cromosoma 1 de rata (Kaisaki et al. 1998).

La estructura del gen UCP2 es similar a la del gen UCP1, la secuencia codificante está distribuida en 6 exones codificando cada uno de ellos un dominio transmembrana. Sin embargo, el gen UCP2 tiene dos exones no traducidos localizados en la región 5'. Se ha demostrado que el codon de iniciación de la traducción está en el exón 3 (Pecqueur et al. 1999). Además, al contrario de UCP1, el promotor de la UCP2 no presenta ni caja CAAT ni TATA, sino motivos de unión de la caja CCAAT y de la caja Y, además de una secuencia rica en GC (Yamada et al. 1998)

Tanto a nivel transcripcional, como a nivel traduccional UCP2 está altamente regulada. En cuanto a la regulación transcripcional, en regiones cercanas al promotor se encuentran sitios de unión a factores de transcripción como Sp1, AP-1, AP-2 y

receptores de la familia PPAR (Ricquier and Bouillaud 2000). Así, se ha demostrado que PPAR α y PPAR δ regulan la expresión del gen de UCP2 en el músculo esquelético y corazón (Villarroya et al. 2007). También se ha visto que la proteína SREBP-1c induce la transcripción de UCP2 (Takahashi et al. 2005) y que Sirt-1 la inhibe uniéndose a su promotor (Moynihan et al. 2005). Es probable que la interacción de los ácidos grasos con estos receptores pueda potenciar la transcripción del gen UCP2.

En relación con la regulación a nivel traduccional se ha descrito que cambios en los niveles de ARN mensajero no necesariamente están acompañados de cambios en los niveles de proteína y viceversa (Pecqueur et al. 2001; Hurtaud et al. 2006). Esto es debido a la existencia de una secuencia no codificante de 36 aminoácidos localizada en la posición 5' de la región de marco de lectura abierto (del inglés *open reading frame*), altamente conservada entre las distintas especies (Jastroch et al. 2004). La delección de esta secuencia aumenta la traducción de la UCP2, sugiriendo que tenga algún papel sobre la regulación traduccional de la proteína (Pecqueur et al. 2001; Ledesma et al. 2002)

El posible papel desacoplante de la UCP2 se sustenta en su alta homología de secuencia con la UCP1 (Fleury et al. 1997; Gimeno et al. 1997). Además, en estudios funcionales en levaduras recombinantes se ha observado que la expresión de UCP2 es capaz de disminuir el potencial de membrana mitocondrial (Fleury et al. 1997; Gimeno et al. 1997). Del mismo modo, estudios de termometría infrarroja han mostrado que la expresión de UCP2 en levaduras induce producción de calor (Paulik et al. 1998). También cabe destacar aquellos estudios en los que se incorporó UCP2 y UCP3 humanas, procedentes de bacterias recombinantes, en liposomas. Se observó que estas dos proteínas permitían un flujo de protones a través de la membrana liposomal, demostrando así su capacidad transportadora de protones (Jaburek et al. 1999). Además, se ha demostrado que el desacoplamiento mitocondrial en timocitos aislados de ratones controles y deficientes en UCP2 depende de la expresión de UCP2 (Krauss et al. 2002). Por otro lado, la inducción de UCP2 en hepatocitos de ratones *ob/ob* se asoció con un aumento de la velocidad de salida de protones de sus mitocondrias (Chavin et al. 1999).

Sin embargo, no está totalmente aclarado el papel de UCP2 en la termogénesis inducida por el frío. Así, mientras Fleury et al (1997) no hallaron cambios en los niveles de expresión del mRNA de UCP2 en tejidos de ratones mantenidos a 4 °C durante 16 horas, otros autores han demostrado un incremento en los niveles de mRNA de UCP2

en TAM de ratones expuestos al frío durante 5 horas (Carmona et al. 1998), o en TAM, corazón y músculo esquelético de ratas expuestas durante 48 horas a 5 °C (Boss et al. 1997). Además ratones *KO* para UCP2 mostraron la misma temperatura corporal que los ratones controles cuando se exponían a 5 °C durante 4 o 24h (Arsenijevic et al. 2000).

Asimismo, el hecho de que endotoxinas bacterianas y el $\text{TNF}\alpha$ sean capaces de estimular la expresión de UCP2 en diferentes tejidos sugiere su participación en el proceso inflamatorio, posiblemente disminuyendo la generación de especies reactivas de oxígeno (EROs) en la mitocondria (Busquets et al. 1998; Cortez-Pinto et al. 1998; Arsenijevic et al. 2000). En este sentido, trabajos con ratones *knockout* para UCP2 muestran una mayor producción de EROs en macrófagos, lo que confiere a las células resistencia a infecciones parasitarias (Arsenijevic et al. 2000). Además, se han publicado varios estudios en los que se demuestra una inducción de la expresión de UCP2 con el estrés oxidativo (Lee et al. 1999; Pecqueur et al. 2001).

Por otro lado, una serie de estudios han destacado el posible papel de la UCP2 en el control del metabolismo de la glucosa y de los lípidos, como luego se comentará (Cortez-Pinto et al. 1998; Fleury and Sanchis 1999; Boss et al. 2000). Por otro lado, se ha sugerido la posible participación de alteraciones en la expresión de UCP2 en el desarrollo de obesidad y de diabetes mellitus (Chan et al. 2004), como también se comentará.

La expresión de UCP2 en TAM, TAB y músculo esquelético está estimulada por T_3 , leptina, ácidos grasos libres, tiazolidindionas y $\text{TNF}\alpha$, mientras que los agonistas β adrenérgicos la inhiben.(Fleury and Sanchis 1999; Boss et al. 2000; Ricquier and Bouillaud 2000; Fukuda et al. 2007).

1.2.3 Proteína desacoplante 3 (UCP3)

La estructura del gen UCP3, clonado en 1997 (Boss et al. 1997; Gong et al. 1997), es similar a la del gen UCP1. La secuencia codificante está distribuida en 6 exones codificando cada uno de ellos un dominio transmembrana. Sin embargo, el gen UCP3 tiene un exón no traducido localizado en la región 5'.

Se ha demostrado que los genes UCP2 y UCP3 tienen una localización adyacente, estando el gen UCP2 7 y 8.2 kb “downstream” del gen UCP3, en el hombre y en el ratón, respectivamente (Pecqueur et al. 1999). Esto sugiere un mecanismo de duplicación génica en la formación de alguno de ellos, a partir del otro. Por tanto, el gen UCP3 está localizado en los mismos cromosomas que el gen UCP2, es decir en el

cromosoma 7 de ratón, en el cromosoma 11 humano y en cromosoma 1 de rata como ya se ha mencionado antes.

UCP3 es una proteína de 34 Kda localizada principalmente en mitocondrias de músculo esquelético, aunque en roedores también se expresa en TAM y mucho menos en TAB. Se observó que en humanos existían dos isoformas: UCP3L (long) y UCP3S (short) de 311 y 274 aminoácidos, respectivamente. En la UCP3L se encuentran las estructuras más importantes de la proteína desacoplante por excelencia (UCP1), como por ejemplo los seis dominios transmembrana y las regiones de unión de nucleótidos. Sin embargo, la isoforma humana denominada UCP3S únicamente posee 5 dominios transmembrana y carece de la secuencia de aminoácidos en la que se unen los nucleótidos purínicos y que poseen las demás proteínas desacoplantes. Ambas isoformas de la UCP3 se expresan en la misma proporción en el músculo esquelético (Boss et al. 1997; Millet et al. 1997). En roedores, la UCP3 y la UCP1 son homólogas en un 54%, mientras que en el caso de las variantes humanas, la UCP3L es homóloga en un 57% a la UCP1. El nivel de identidad existente entre la UCP3 en roedores y la UCP3L de humanos con la UCP2 de la especie correspondiente oscila entre el 72 y 73% (Boss et al. 1997; Vidal-Puig et al. 1997).

La expresión de UCP3 en levaduras induce una disminución del potencial de membrana mitocondrial, a la par que un menor acoplamiento entre la respiración y la fosforilación oxidativa, y un marcado aumento en la generación de calor (Hinz et al. 1999; Zhang et al. 1999). Otros estudios han demostrado que, incluso la isoforma de la proteína desacoplante que más diferencias presenta con la UCP1, la UCP3S de humanos, posee actividad desacoplante (Hagen et al. 1999; Schrauwen et al. 1999). No obstante, otros autores han obtenido resultados que -en principio- no apoyan la hipótesis de que estas proteínas sean capaces de cortocircuitar el flujo de protones entre la cadena respiratoria y la fosforilación oxidativa. En este sentido, describieron falta de concordancia existente entre el incremento de los niveles de mRNA de UCP2 y UCP3 en músculo de animales sometidos a ayuno y la conductancia de protones (Cadenas et al. 1999), hecho que parece no concordar con la función atribuida a estas proteínas.

Gracias a la obtención de ratones *knockout* para el gen UCP3 se ha podido determinar con mayor precisión la posible función de esta proteína. Las mitocondrias de músculo esquelético y de TAM de estos animales se hallan más acopladas que en los animales controles, demostrando así que UCP3 actuaría como desacoplador de la

fosforilación oxidativa. Sin embargo, estos ratones no presentan alteraciones que pudieran hacer pensar en una posible función de UCP3 en el metabolismo energético (Gong et al. 2000; Vidal-Puig et al. 2000). La única diferencia que se observó en estos animales respecto a los ratones control es un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno en las mitocondrias.

Sin embargo, la sobreexpresión de la forma humana de UCP3 en músculo esquelético en ratones transgénicos ha revelado que esta proteína puede influenciar de forma considerable en el metabolismo basal y la homeostasis de la glucosa en todo el organismo (Clapham et al. 2000). Sin embargo, los mismos autores concluyen que el desacoplamiento de la respiración en estos ratones puede ser un artefacto de la expresión del transgén (Cadenas et al. 2002).

La función de la proteína UCP3 en el metabolismo no está clara y aún continua siendo objeto de debate, pero múltiples evidencias indican que podría estar implicada en la oxidación de ácidos grasos en el músculo esquelético (Bezaire et al. 2001; Garcia-Martinez et al. 2001; Himms-Hagen and Harper 2001). De hecho, la presencia de UCP3 en células musculares favorece la oxidación de ácidos grasos frente a la de glucosa (Garcia-Martinez et al. 2001; Bezaire et al. 2005). Lo mismo ocurre cuando la UCP3 se expresa en células de insulinoma (Hong et al. 2001).

Además, diferentes estudios consideran la proteína UCP3 como moduladora de la formación de especies reactivas de oxígeno en la mitocondria (MacLellan et al. 2005; Nabben et al. 2008; Jiang et al. 2009).

En cuanto a la modulación de su expresión génica, la UCP3 de músculo esquelético se induce por ácidos grasos, leptina, T3, ácido retinoico, LPS y glucocorticoides (Gong et al. 1997; Weigle et al. 1998; Villarroya et al. 2001; Felipe et al. 2003; Sun et al. 2003; Solanes et al. 2005).

1.2.4 Otros análogos de UCPs

Más recientemente, dos nuevas proteínas homólogas de la UCP1 han sido clonadas, estando presentes en tejidos humanos y de ratón. Son la UCP4 y la BMCP1 (brain mitochondrial carrier protein-1), cuyas correspondientes secuencias de aminoácidos presentan una identidad con la UCP1 de 29% y 34%, respectivamente. La UCP4 se expresa predominantemente en cerebro, sin embargo, BMCP1 se expresa también en otros tejidos (hígado, músculo esquelético, corazón, etc...) en grado variable (Smorodchenko et al. 2009). Tanto la expresión de UCP4 como de BMCP1 es inducida por el frío, al igual que ocurre con la UCP1, lo cual sugiere un

papel de estas proteínas en procesos de termogénesis (Yu et al. 2000; Liu et al. 2006). También parecen participar en la reducción de la formación de especies reactivas de oxígeno (Ricquier and Bouillaud 2000; Yu et al. 2000; Goglia and Skulachev 2003). Por otra parte, en estudios en levaduras y en líneas celulares se ha observado que la expresión de BMCP1 conlleva un desacoplamiento de la respiración mitocondrial. (Sanchis et al. 1998; Yu et al. 2000; Kim-Han et al. 2001). También se ha demostrado el papel desacoplante de la proteína UCP4 en diferentes modelos celulares (Gao et al.; Mao et al. 1999).

La existencia de proteínas desacoplantes en plantas, originalmente llamadas PUMP (Plant Uncoupling Mitochondrial Protein) fue establecida por análisis del potencial de membrana en mitocondrias de tubérculos de patata determinando la capacidad de los ácidos grasos de colapsar el potencial de membrana mitocondrial de un modo que era inhibido por nucleótidos de purina (Jezek et al. 1996). La PUMP es una proteína de 32 kDa y su actividad ha sido reconstituida en proteoliposomas (Jezek et al. 1997). La existencia de estas proteínas desacoplantes fue mostrada en una variedad de órganos y tejidos de plantas por inmunodetección a menudo usando anticuerpos que reaccionaban entre diferentes especies (Jezek et al. 1998; Jezek et al. 2000).

El papel de las proteínas desacoplantes en plantas está aún por determinar. Algunas de ellas (StUCP, AtUCP1) se inducen con bajas temperaturas sugiriendo un papel termogénico análogo a la UCP1 en mamíferos. Así, se ha observado la inducción de la expresión del mRNA de StUCP en tubérculos de patata expuestos a bajas temperaturas (4°C durante varios días) (Nantes et al. 1999), con una consecuente estimulación de la respiración (Calegario et al. 2003).

Por otra parte, el frío no produjo cambios en el patrón de expresión de las proteínas desacoplantes en el trigo (Murayama and Handa 2000), arroz (Watanabe and Hirai 2002) o AtUCP2 (Watanabe et al. 1999).

Además, se ha propuesto un papel de las proteínas desacoplantes en la maduración de la fruta. Así, se observó una disminución de la proteína UCP durante la maduración del tomate (Almeida et al. 1999; Almeida et al. 2002). Sin embargo, el contenido de UCP mitocondrial tiende a aumentar en el mango durante dicho proceso (Considine et al. 2001).

La expresión de las proteínas desacopladoras en plantas también se ha relacionado con los niveles de especies reactivas de oxígeno existentes (Van Aken et

al. 2009). De hecho plantas del tabaco que sobreexpresan AtUCP aumentan la tolerancia al estrés oxidativo (Brandalise et al. 2003).

Por otro lado, se han realizado numerosos estudios (Almeida et al. 1999; Costa et al. 1999; Nantes et al. 1999; Pastore et al. 2000; Hourton-Cabassa et al. 2002; Ito et al. 2006) para demostrar la posible capacidad de estas proteínas para desacoplar la fosforilación oxidativa en plantas, concluyendo que su papel desacoplante no parece ser muy relevante. Además, se han descubierto proteínas desacoplantes en hongos y protozoos (Jarmuszkiewicz et al. 1999; Jarmuszkiewicz et al. 2000).

1.3 ASPECTOS FISIOPATOLÓGICOS DE LAS UCPs

1.3.1 Relación de las UCPs con el metabolismo basal.

Aunque es un tema todavía controvertido, diferentes estudios independientes sugieren que UCP1, UCP2 y UCP3 están implicadas en el control del gasto energético basal. Esto está en conexión con el hecho de que -en la mayoría de los tejidos- el grado de desacoplamiento basal de la membrana mitocondrial interna está asociado con el nivel de metabolismo en reposo (Stuart et al. 2001).

Se han estudiado algunas variaciones en el gen que codifica para UCP1 que pueden influir en la función de dicha proteína. Existen estudios sobre las sustituciones de aminoácidos Met229Leu, Ala64Thr y A1766G que parecen estar asociados con el aumento del índice de masa corporal (IMC) (Herrmann et al. 2003; Shin et al. 2005) y con la aparición de diabetes mellitus tipo 2 (Mori et al. 2001). También el polimorfismo A3826G, localizado en el promotor del gen, ha sido objeto de numerosos trabajos. Así, aunque existen estudios en los que no se ha encontrado asociación entre ese polimorfismo y la obesidad (Gagnon et al. 1998; Schaffler et al. 1999; Nieters et al. 2002), otros autores asocian este polimorfismo con un aumento del índice de masa corporal (IMC) (Hayakawa et al. 1999; Heilbronn et al. 2000; Sramkova et al. 2007) y con la aparición de diabetes (Hayakawa et al. 1999).

También se analizaron microsatélites marcadores del locus 11q13 del gen UCP2 en 640 individuos pertenecientes al “Québec Family Study”. Usando una estrategia de análisis de ligamiento, se mostró por vez primera una estrecha relación entre algunos de estos marcadores genéticos y los valores del metabolismo basal medidos (Bouchard et al. 1997). Asimismo, se analizaron las frecuencias de dos polimorfismos

del locus UCP2/UCP3 en indios Pima no diabéticos, concluyendo que ciertas variantes polimórficas de UCP2 estaban relacionadas con el nivel de gasto energético medido durante el sueño (Walder et al. 1998; Kovacs et al. 2005). También se han descrito polimorfismos del gen UCP2 que parecen estar asociados con el IMC (Esterbauer et al. 2001; Lee et al. 2008; Jia et al. 2009).

Otro estudio en humanos puso de manifiesto la existencia de una correlación positiva entre los niveles de UCP3 muscular y el valor del metabolismo basal, así como de una correlación negativa entre los niveles de esta proteína y el IMC. Esto significa que bajos niveles de UCP3 suponen un metabolismo basal disminuido y un IMC elevado (Schrauwen et al. 1999). Dado que un metabolismo basal disminuido es un factor que predispone al desarrollo de obesidad, estos resultados sugieren que la presencia de bajos niveles de UCP3 en músculo esquelético puede favorecer el incremento de peso corporal.

Por el contrario, Millet y col, no observaron diferencias significativas en los niveles de mRNA de UCP2 y UCP3 en músculo de individuos obesos y no obesos, pero vieron una correlación positiva entre el nivel mRNA de UCP2 en tejido adiposo y el índice de masa corporal (Millet et al. 1997). El mismo grupo también midió los niveles de mRNA de UCP2 en tejido adiposo abdominal de mujeres obesas premenopáusicas y observaron que estaba directamente relacionado con el nivel de su metabolismo basal (Barbe et al. 1998). No obstante, otros autores no han encontrado relación entre los niveles de mRNA o proteína UCP2 en músculo esquelético y el valor del metabolismo basal en sujetos obesos y diabéticos (Bao et al. 1998; Simoneau et al. 1998).

Se han identificado diferentes polimorfismos (V102I, T210T) en la UCP3 relacionados con la oxidación basal de ácidos grasos (Argyropoulos et al. 1998; Chung et al. 1999; Lanouette et al. 2002). Otro polimorfismo es el encontrado en la región del promotor del gen de la UCP3 (C55T). Algunos autores no han podido establecer asociación entre este polimorfismo y la obesidad (Schrauwen et al. 1999; Dalgaard et al. 2001; Berentzen et al. 2005), pero otros lo relacionan con el IMC (Otabe et al. 2000; Halsall et al. 2001; Alonso et al. 2005; Liu et al. 2005), mayor porcentaje de grasa y mayor cociente cintura:cadera (Cassell et al. 2000; Yanagisawa et al. 2001; Herrmann et al. 2003).

1.3.2 Relación de las UCPs con el metabolismo lipídico, la obesidad y la diabetes.

Los cambios en el peso dependen del balance entre la ingesta calórica y el gasto energético. La ingesta calórica depende por completo de la ingesta de alimentos. En contraste, el gasto energético es un proceso más complejo. Además de la energía consumida en el mantenimiento del recambio metabólico y en el ejercicio muscular, la energía se utiliza también para la generación de calor, fenómeno indispensable para la vida de los animales homeotermos y que supone un alto porcentaje dentro del metabolismo basal (Boss et al. 1998). La generación de calor también se produce durante el consumo de alimentos o en situaciones de estrés, como el frío o la fiebre (fenómeno conocido como termogénesis facultativa).

Dado que las proteínas desacoplantes parecen tener un papel en la modulación de la termogénesis y de este modo sobre el metabolismo basal, es lógico establecer una relación inversa entre el grado de expresión de las UCPs y la propensión al desarrollo de obesidad. Así, se observó que ratones transgénicos que no expresaban UCP1 (*knockout* para UCP1) desarrollaban obesidad a una edad muy temprana (Lowell et al. 1993; Kontani et al. 2005; Feldmann et al. 2009). Además, cuando se sobreexpresa la proteína UCP1 en ratones, se previene el desarrollo de obesidad (Kopecky et al. 1995; Kozak and Koza 1999; Li et al. 2000).

El papel de la UCP2 en la prevención de la obesidad queda patente en un estudio en el que se observó que al alimentar ratones de dos cepas diferentes con una dieta alta en lípidos, una de las cepas de ratones (C57BL/6J) desarrollaba obesidad mientras que la otra (A/J) mantenía un peso normal (Fleury et al. 1997). Los animales que no desarrollaron obesidad presentaban niveles superiores de mRNA de UCP2 en TAB, en relación con los niveles de mRNA detectados en el TAB de los ratones que sí desarrollaron obesidad (Surwit et al. 1998; Watson et al. 2000). Además, la expresión de UCP2 fue marcadamente más alta en TAB de ratones *ob/ob* (deficientes en la hormona leptina) y *db/db* (deficientes en el receptor de leptina) (Gimeno et al. 1997; Chavin et al. 1999; Masaki et al. 2000), en comparación con la expresión observada en los correspondientes ratones controles, supuestamente como un mecanismo compensatorio para contrarrestar la obesidad asociada a estas disfunciones. Otra evidencia fue la inducción del mRNA de UCP2 en hepatocitos de ratón y rata (Nakatani et al. 2002) alimentados con dieta hiperlipídica. Del mismo modo, también se observó inducción del mRNA de UCP3 en músculo esquelético de ratones (Gong et al. 1999; Felipe et al. 2003), ratas (Matsuda et al. 1997; Weigle and Levin 2000) y

humanos (Schrauwen et al. 2001) alimentados con dieta alta en lípidos. Además, cuando se sobreexpresa la proteína UCP3 en tejido adiposo de ratones, se previene el desarrollo de obesidad (Costford et al. 2006).

Por otro lado, en ratas diabéticas por administración de estreptozotocina (situación también con niveles elevados de ácidos grasos libres circulantes) se produce una importante inducción de la expresión de UCP2 y UCP3 en el músculo esquelético (Kageyama et al. 1998).

El aumento de los niveles de expresión de los mRNA de UCP2 y UCP3 en el músculo esquelético y corazón de roedores con diabetes tipo I (Kageyama et al. 1998; Hidaka et al. 1999) y en humanos con diabetes tipo II (Bao et al. 1998; Krook et al. 1998; Vidal et al. 1999) no es fácil de interpretar, ya que son múltiples los parámetros que se alteran en la diabetes. Sin embargo, diferentes estudios han implicado a las UCPs en la utilización de glucosa, la resistencia a la insulina e incluso en la secreción de insulina. Así, se ha propuesto que un aumento de la expresión de las UCPS podría aportar una defensa frente a la obesidad y la consiguiente diabetes que con frecuencia la acompaña (Clapham et al. 2000; Esterbauer et al. 2001; Ishigaki et al. 2005).

La relación de las UCPs con el consumo de glucosa, se ha podido establecer estudiando los niveles de mRNA de UCP3 en el músculo y el consumo de glucosa total estimulado por insulina en humanos (Krook et al. 1998). Del mismo modo, el aumento del consumo de glucosa provocado por el ejercicio también se acompañó de un incremento de los niveles de expresión de UCP2 y UCP3 en músculo esquelético (Tsuboyama-Kasaoka et al. 1998; Cortright et al. 1999; Fritz et al. 2006).

Por otro lado, estudios basados en la utilización de antidiabéticos de la familia de las tiazolidindionas reafirman también el papel de las UCPs en la utilización de glucosa. De hecho, se ha demostrado que los niveles de mRNA de UCP2 en músculo esquelético se correlacionaron directamente con los niveles de glucosa circulante en ratas tratadas con tiazolidindionas, sugiriendo que estos fármacos podrían aumentar el catabolismo de la glucosa incrementando la expresión de UCP2 en músculo (Shimokawa et al. 1998). Asimismo, en otro estudio se ha observado una relación directa entre los niveles de expresión de mRNA de UCP2 y UCP3 y la concentración de glucosa circulante a las dos horas tras una sobrecarga de glucosa (Samec et al. 1999).

Además, hemos de mencionar que ratones transgénicos con sobreexpresión de GLUT4 en músculo, presentan un mayor consumo de glucosa y niveles aumentados

de UCP3 en el músculo, apoyando la hipótesis de que la expresión de las UCPs puede favorecer el mayor consumo de glucosa por el músculo estimulando la oxidación de este azúcar (Tsuboyama-Kasaoka et al. 1999).

Diversos estudios han relacionado a las UCPs con la secreción de insulina. Así, en células beta pancreáticas se ha observado que la sobreexpresión de UCP2 inhibe la secreción de insulina estimulada por glucosa (Chan et al. 1999), mientras que la disminución de los niveles de UCP2 aumenta la secreción de dicha hormona (Affourtit and Brand 2008). Esto estaría en concordancia con un estudio de ratones knockout para UCP2 que secretan más insulina en respuesta a glucosa (Zhang et al. 2001) y a una dieta alta en lípidos (Joseph et al. 2002). También se ha visto que la inducción de UCP1 en células de insulinoma inhibe la secreción de insulina (Nakazaki et al. 2002), mientras que esto no ocurre cuando se sobreexpresa UCP3 (Hong et al. 2001).

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

El papel de la proteína desacoplante UCP2 en el control del metabolismo energético mitocondrial, así como su relación con el metabolismo de los lípidos y de la glucosa y su implicación en el desarrollo de obesidad y diabetes, es un tema controvertido. Del mismo modo, muy poco se sabe de la repercusión que sobre estos aspectos tiene el incremento de la expresión de UCP2 en el hígado, órgano con un destacado papel en el control del metabolismo intermediario.

Así, con objeto de estudiar la importancia fisiopatológica de la proteína desacoplante UCP2 desarrollamos un modelo de ratón transgénico que sobreexpresa el gen hUCP2 en hígado.

En la primera parte de nuestro trabajo nos planteamos la caracterización bioquímica de los animales transgénicos que sobreexpresan el gen hUCP2 en hígado y su comparación con animales controles. Para ello, analizamos el nivel de expresión de la proteína UCP2 en hígado y su función desacoplante mediante la medición del consumo de O₂, potencial de membrana mitocondrial y niveles hepáticos de nucleótidos de adenina.

Por otro lado, existen múltiples evidencias de que cambios en la expresión o actividad de las proteínas desacoplantes están relacionados con el control de la masa corporal y el desarrollo de obesidad. En este sentido, hemos estudiado la respuesta de los animales transgénicos y controles a una dieta alta en lípidos (42%) durante tres meses, analizando la ganancia de peso, la distribución del tejido graso, así como los niveles plasmáticos de glucosa, insulina, triglicéridos, ácidos grasos libres y colesterol y la respuesta a las pruebas de tolerancia a la glucosa e insulina.

En la última parte del trabajo, con objeto de estudiar *in vitro* los efectos que la expresión del gen hUCP2 tiene sobre el metabolismo hepático de la glucosa nos planteamos desarrollar un modelo celular de hepatocitos cultivados capaces de expresar este transgén. Una vez desarrollado el modelo celular analizamos la funcionalidad de la proteína hUCP2 midiendo el consumo de O₂, el potencial de membrana y los niveles de los nucleótidos de adenina en los hepatocitos transfectados. Por último, con objeto de investigar el estado del metabolismo de la glucosa en los hepatocitos que sobreexpresan hUCP2, estudiamos el consumo y destino metabólico de la glucosa y el flujo gluconeogénico en este modelo celular.

MATERIALES Y MÉTODOS

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 APARATOS

Para la preparación de reactivos, se usó una balanza de precisión de la marca Mettler (modelo H33), un granatario marca Sartorius (modelo BP1200) y un pHmetro marca Metrohm (modelo 713).

En los experimentos con cultivos primarios, los hepatocitos se obtuvieron mediante perfusión del hígado con una bomba de perfusión Eyela (modelo MP-3). El conteo de los hepatocitos aislados se realizó con un microscopio óptico Nikon (modelo Labophot), mientras que la observación de los hepatocitos en las placas de cultivo se llevó a cabo mediante un microscopio de contraste de fases Nikon (modelo Eclipse TE-300).

La siembra y manipulación de los hepatocitos en cultivo se realizó en una campana de flujo laminar Telstar (modelo BIO-II-A). Las placas con los hepatocitos cultivados se mantuvieron en un incubador de células de la marca Forma Scientific (modelo 3111), a 37 °C, en un ambiente de O₂/CO₂ (95%/ 5%).

La homogeneización de las muestras celulares y tisulares se llevó a cabo con un homogeneizador Polytron de la marca Kinematica (modelo PT-1200).

Las centrifugaciones a baja velocidad se realizaron en una centrífuga de la marca Heraeus (modelo Labofuge M). Para las centrifugaciones de alta velocidad se dispuso de una centrífuga refrigerada de la marca Beckman (modelo J2-21) y de una microcentrífuga Heraeus, (modelo Biofuge Fresco).

Para las medidas espectrofotométricas se usó un espectrofotómetro UV/V de la marca Kontron Instruments (modelo Uvikon 940), otro de la marca Shimadzu (modelo UV-2401PC), así como un lector de microplacas de la marca Molecular Devices (modelo Spectra MAX 340), todos ellos termostatizados. Los ensayos fluorimétricos se llevaron a cabo con un espectrofluorímetro Perkin Elmer (modelo LS-50B).

Las electroforesis de los ácidos nucleicos y de los extractos de proteínas celulares se realizaron con fuentes de alimentación de la marca BioRad (modelos Power PAC 300 y 200/2.0), así como con cubetas de electroforesis para ácidos nucleicos (modelos Mini-Subcell GT y Subcell GT) y para proteínas (modelo Mini Protean II-2D) de la misma casa comercial. Para la fijación covalente de los ácidos

nucleicos a las membranas de nylon se empleó un “UV-crosslinker” de Amersham Life Sciences.

Para la medida del consumo de O₂ y del potencial de membrana se utilizó un electrodo de Clark (YSI 5331), con un registrador Servograph (modelo Rec 51). La radiación beta de los compuestos marcados con ¹⁴C y con ³²P se determinó con la ayuda de un contador de centelleo líquido de la marca Beckman (modelo LS 1701).

3.2 REACTIVOS

El suero bovino fetal fue suministrado por Gibco BRL (Gaithersburg, Alemania). Los medios de cultivo M-199 y L-15 se obtuvieron de ICN Ibérica, S.A. (Barcelona, España) y las placas de cultivo utilizadas fueron proporcionados por NUNC (Roskilde, Dinamarca).

La insulina humana monocomponente se obtuvo de Novo Industri (Copenhague, Dinamarca). La dexametasona fosfato (Fortecortín) fue suministrada por Merck (Darmstadt, Alemania). La triiodotironina y la proteinasa K, se obtuvieron de Sigma-Aldrich Química (St. Louis, MO, USA). El pentotal sódico y la heparina se obtuvieron de Abbott Ireland (Sligo, Irlanda) y de Leo (Madrid, España), respectivamente. La colagenasa A de *Clostridium histolyticum*, las endonucleasas de restricción para la purificación de las sondas de ADNc, fueron suministradas por Roche Diagnostics (Barcelona, España).

Los productos radioactivos, el kit de marcaje de ácidos nucleicos (Rediprime II) y el reactivo de ECL se obtuvieron de Amersham Pharmacia Biotech (Buckinghamshire, Inglaterra). Las membranas de nylon (Nytran 0,45) utilizadas para los ensayos de *Northern* y *Southern blot* fueron suministradas por Biotrace (Scheleicher & Schuell, Dassel, Alemania). Las membranas de difluoruro de polivinilideno (PVDF) utilizadas en los ensayos de *Western blot* fueron suministradas por Millipore Corp. Ibérica, SA (Madrid, España). El líquido de centelleo (Optiphase Hisafe II) fue suministrado por LKB Wallac (Turku, Finlandia).

El plásmido pBluescript SK (-) conteniendo el cDNA del gen humano de la UCP2 fue donado por el Dr. Jean Paul Giacobino (Universidad de Ginebra, Suiza). El kit de aislamiento de ARN Ultraspec se obtuvo de Biotecx (Houston, Texas, USA). El anticuerpo UCP2 fue suministrado por Calbiochem (Darmstadt, Alemania) y el anticuerpo COX I por Molecular Probes (Leiden, Holanda). El enzima de restricción Pvu II fue suministrado por Roche Molecular Biochemicals (Mannheim, Alemania).

La determinación de la concentración plasmática de insulina y ácidos grasos se llevó a cabo utilizando kits de análisis obtenidos, respectivamente, de Cristal Chem Inc (Chicago, Illinois, USA) y Wako Chemicals (Neuss, Alemania), mientras que los niveles plasmáticos de triglicéridos y colesterol se determinaron utilizando kits de ensayo de Sigma Diagnostics (St. Louis, MO, USA). El resto de los reactivos, sustratos, enzimas y coenzimas fueron suministrados por Roche Diagnostics, Sigma-Aldrich Química y Merck (Darmstadt, Alemania).

3.3 ANIMALES

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar de 200-250 g de peso. Los animales fueron suministrados por el estabulario del Instituto de Investigaciones Biomédicas del C.S.I.C., en el que permanecieron hasta el momento de su utilización (13-17 semanas de edad).

Los ratones transgénicos (C57BL6/SJL) que sobreexpresan el gen humano UCP2 fueron desarrollados en colaboración con el grupo de investigación que dirige la Prof. Fátima Bosch, en el Centro de Biotecnología Animal y Terapia Génica de la Universidad Autónoma de Barcelona. Estos animales sobreexpresan el gen humano UCP2 en las células parenquimatosas del hígado bajo el control del promotor de la PEPCCK (fragmento XbaI-BglII de -450 pb a +73pb). En este estudio se usaron ratones transgénicos hetero y homocigotos con el número de copia génica más alto (4 veces). También utilizamos ratones controles de la estirpe (C57BL6/SJL).

Tanto las ratas Wistar como los ratones controles y transgénicos fueron alimentados con una dieta de mantenimiento A04 (Panlab, Barcelona, España) y agua *ad libitum*. Además, los animales fueron estabulados en condiciones de temperatura controlada (23 °C) y con ciclos de iluminación de 12 horas. Cuando se indica, ratones transgénicos y controles de 3 meses de edad se alimentaron con una dieta alta en lípidos (42 %) (TD 88137, Harlan Teklad, Madison, Wis., USA), durante otros 3 meses más. Los animales se manipularon cumpliendo en todo momento la normativa del RD 1201/2005, de 10 de Octubre, sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos (BOE núm. 252). Además, los protocolos de actuación contaron con la aprobación del Comité de Ética y de Experimentación Animal de la Universidad Autónoma de Madrid. Antes de ser sacrificados, los animales se anestesiaron con una mezcla de ketamina/rompún (150 mg/ 10 mg por kg peso, inyectada por vía intraperitoneal).

3.4 OBTENCIÓN DE RATONES TRANSGÉNICOS

La obtención de la cepa de animales transgénicos que sobreexpresan el gen humano UCP2 se realizó en el Centro de Biotecnología Animal y Terapia Génica (CBATEG) de la Universidad Autónoma de Barcelona, mediante microinyección del gen quimérico pPEPCK/UCP2 a óvulos fecundados de ratón. Para ello, se recogieron óvulos fecundados de hembras superovuladas (C57BL6/SJL) a las 6-8 horas de la ovulación. A continuación, se microinyectaron 2 μ l de la solución de DNA (4 ng/ μ l) en el pronúcleo masculino. Los embriones microinyectados se trasplantaron a madres receptoras (CD-1). Tres semanas después del nacimiento de las crías se aisló el DNA genómico de la cola, como se describe posteriormente, y se analizó la presencia del transgén hUCP2 mediante la técnica del *Southern blot*, a fin de detectar la presencia de ratones transgénicos (animales fundadores F0) con los que iniciar la colonia.

3.5 CULTIVO PRIMARIO DE HEPATOCITOS

3.5.1 Obtención de hepatocitos

La obtención de hepatocitos de rata para los cultivos primarios se realizó mediante perfusión *in situ* del hígado con medio Krebs-Henseleit sin calcio suplementado con glucosa y collagenasa A, según el método descrito por Krebs y col (Krebs 1974), con las modificaciones introducidas por Hue y col (Hue et al. 1975).

3.5.1.1 Sistema de perfusión

La perfusión del hígado se llevó a cabo mediante un sistema de perfusión cerrado que constaba de los siguientes elementos (**Figura I**):

- A: Depósito colector.
- B: Baño termostatzado.
- C: Bomba de perfusión peristáltica.
- D: Plataforma donde se coloca el animal.

El depósito colector contiene el medio de perfusión que fue gaseado con O₂ / CO₂ (95 %/ 5 %). La bomba de perfusión toma el medio del depósito colector y lo transfiere a

un atrapaburbujas que se encuentra sumergido en el baño termostatzado a 38 °C. La regulación de la fuerza impelente de la bomba de perfusión se realizó de tal modo que el flujo del medio de perfusión fuera de aproximadamente 30-35 ml/min. Un catéter de plástico situado al final del atrapaburbujas permite que dicho medio llegue al hígado por la vena porta a una temperatura de 36 - 37 °C, y que posteriormente retorne al depósito colector por otro catéter situado en la vena cava superior, cerrando así el circuito.

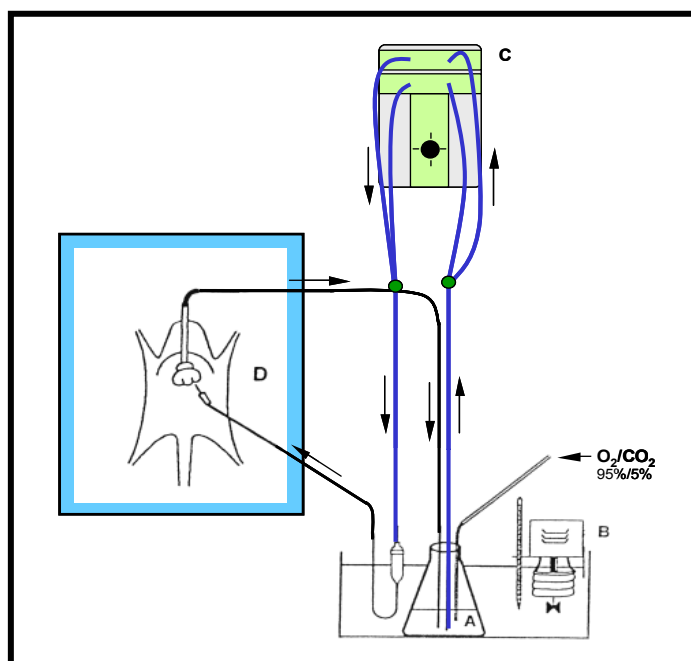


Figura I. Sistema de perfusión. A, depósito colector; B, baño termostatzado; C, bomba peristáltica; D, plataforma.

3.5.1.2 Medio de perfusión

El hígado se perfundió con 300 ml de medio Krebs-Henseleit sin calcio, compuesto por: NaCl 118 mM, KCl 4,75 mM, KH₂PO₄ 1,18 mM, MgSO₄ 1,18 mM y NaHCO₃ 25 mM, suplementado con glucosa 10 mM, con penicilina 200 U/ml y estreptomicina 200 µg/ml. El medio se gaseó con O₂/CO₂ (95%/5%) de forma continua para oxigenarlo y también mantener un valor de pH aproximado de 7,35. Con objeto de digerir la trama de colágeno del tejido conectivo hepático, se añadieron 7 unidades de colagenasa A a 100 ml de medio de perfusión, una vez que dicho medio estaba recirculando a través del hígado. La ausencia de calcio en el medio de perfusión facilitó la ruptura de las uniones intercelulares.

3.5.1.3 Procedimiento quirúrgico

La rata se anestesió mediante una inyección intraperitoneal de tiopental sódico (6 mg/100 g de peso). Una vez dormida, se colocó sobre la plataforma y se le inyectaron 0,3 ml de heparina sódica al 1 % a través de la vena femoral, con el fin de evitar la coagulación sanguínea y favorecer así la eliminación del contenido hemático del hígado durante el lavado previo a la perfusión con colagenasa. A continuación, se abrió la pared abdominal y se retiró hacia un lado el paquete intestinal, dejando al descubierto la vena porta y el hilio hepático. En la vena porta se introdujo un catéter de plástico (Abbocath-t 18G, Abbott), que se sujetó con dos ligaduras (**Figura II**) y se conectó al sistema de perfusión. Inicialmente el hígado se perfundió con medio sin colagenasa, eliminándose así el contenido hemático del órgano. Para facilitar su drenaje y evitar el aumento de presión dentro del hígado, se abrió una salida provisional en la vena cava inferior, por debajo de la desembocadura de las venas renales.

Una vez iniciada la perfusión y mientras se lavaba el hígado, se abrió rápidamente la cavidad torácica y se seccionaron los dos nervios frénicos, para evitar los posibles espasmos del diafragma que pudieran obstruir el flujo de salida a nivel de la vena suprahepática. A continuación, se introdujo un catéter de plástico en la porción torácica de la vena cava superior que se sujetó con una ligadura. Posteriormente, se cerró la salida provisional de la cava inferior anudando la ligadura que rodeaba dicha vena. Esto hizo que el catéter situado en la cava superior recogiera todo el flujo de salida procedente del hígado. Cuando quedaron 100 ml de medio en el depósito colector, se cerró el circuito introduciendo el catéter de salida en el mencionado depósito y se añadió colagenasa A a dicho medio (7 U, medidas a 25 °C usando como sustrato 4-fenilazobenzil-oxicarbonil-Pro-Leu-Gly-Pro-D-Arg, según Roche Diagnostics) dejando seguir la perfusión durante unos 15 minutos más.

3.5.1.4 Aislamiento de los hepatocitos

Una vez concluida la perfusión, se procedió a la disgregación mecánica del hígado en una placa de Petri que contenía 10 ml de medio de perfusión, separando la cápsula de Glisson con ayuda de unas pinzas. Posteriormente, el hígado se puso en un vaso de precipitados con 30 ml de medio de perfusión, donde continuó disgregándose ejerciendo sobre él una ligera agitación con ayuda de una espátula de extremos

romos. Este procedimiento continuó hasta la completa disgregación del hígado. A continuación, se completó el medio de perfusión hasta 200 ml y la suspensión tisular resultante se filtró a través de 4 capas de gasa, eliminándose así los fragmentos de hígado no disgregados, y los restos de trama conjuntiva. El filtrado resultante se centrifugó a 50 x g durante 1 minuto, para separar los hepatocitos. Tras desechar el sobrenadante, el sedimento celular se resuspendió en 100 ml de medio Krebs-Henseleit sin glucosa, suplementado con CaCl_2 2,5 mM, antibióticos (penicilina 200 U/ml; estreptomycin 200 µg/ml), previamente gaseado con O_2/CO_2 (95 %/ 5 %). La suspensión celular resultante se filtró de nuevo a través de 4 capas de gasa y se centrifugó a 50 x g, durante 1 minuto. El sedimento celular resultante se resuspendió en medio L-15 suplementado con BSA 0,1% y antibióticos. Las células resuspendidas en este medio se mantuvieron durante 15 minutos a temperatura ambiente con agitación y gaseo (95% O_2 /5% CO_2). Posteriormente, la suspensión celular se centrifugó de nuevo a 50 g durante 1 minuto y el sedimento de hepatocitos se resuspendió en medio de cultivo Earle-199 suplementado con BSA 0,1 %, suero bovino fetal al 10 %, triiodotironina 1 µM, dexametasona 1 µM y antibióticos (penicilina 100 U/ ml y estreptomycin 100 µg/ ml) y glucosa hasta alcanzar una concentración final de 10 mM.

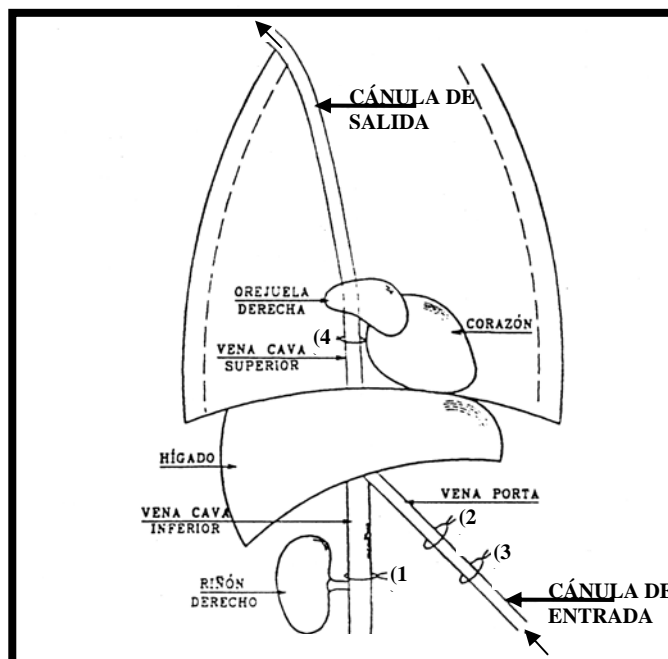


Figura II. Esquema del procedimiento quirúrgico.
(1), (2), (3) y (4), ligaduras

A continuación, se realizó el conteo de los hepatocitos y se ajustó el volumen de medio para que la concentración final de células fuera de $3,0 \times 10^6$ cél/ ml. Justo antes de la siembra, la suspensión celular en medio Earle-199 suplementado se mantuvo en un ambiente de carbógeno y agitación suave, durante 10 minutos, para llevar el pH del medio de cultivo a 7,35. Todo el proceso de aislamiento y siembra de los hepatocitos en placas de cultivo se realizó a temperatura ambiente en una campana de flujo laminar empleando medios estériles.

3.5.1.5 Viabilidad de los hepatocitos

La viabilidad de los hepatocitos aislados se determinó mediante el uso del colorante azul de Tripán al 0,1% disuelto en Krebs-Ringer fosfato (NaCl 118 mM, KCl 4,75 mM, KH_2PO_4 1,18 mM, MgSO_4 1,18 mM, Cl_2Ca 2 mM y $\text{PO}_4(\text{Na}_3)$ 16 mM). En las células con la membrana plasmática dañada, el colorante penetra en su interior y éstas aparecen teñidas de azul al observarlas con el microscopio óptico, mientras que las células que mantienen su membrana íntegra no se tiñen. El conteo de los hepatocitos se realizó en una cámara de Neubauer, considerándose una buena viabilidad de la preparación cuando el porcentaje de células no teñidas superó el 90%.

3.5.1.6 Cultivo y procesamiento de los hepatocitos cultivados

Los hepatocitos aislados se sembraron en placas de cultivo (de 3, 6, ó 10 cm de diámetro) con medio Earle 199, suplementado con 0,1 % BSA, suero bovino fetal al 10%, triiodotironina 1 μM , dexametasona 1 μM , antibióticos (penicilina 100 U/ml; estreptomicina 100 μg / ml) y glucosa hasta alcanzar una concentración final de 10 mM. Todo el proceso de manipulación se realizó en condiciones de esterilidad bajo una campana de flujo laminar y medios estériles.

Antes de la siembra, las placas se cubrieron con suero bovino fetal y se dejaron secar a temperatura ambiente durante 30 minutos, siendo posteriormente lavadas con agua bidestilada. Con este procedimiento se produce la adsorción de la fibronectina existente en el suero a la superficie de la placa. Los hepatocitos se sembraron a una densidad celular de $1,23 \times 10^5$ células/ cm^2 . Transcurridas 4 horas desde la siembra de los hepatocitos, se sustituyó el medio de cultivo por medio Earle-199 fresco con los mismos suplementos, con el fin de retirar las células no adheridas a la superficie de la placa. Los cultivos celulares se mantuvieron en estas condiciones durante 15 horas más. A continuación, las células fueron deprivadas de suero fetal, hormonas y

antibióticos, durante 2 horas antes de ser utilizadas en los diferentes estudios. En el caso de los experimentos de mitocondrias aisladas y medición de los nucleótidos de adenina, las placas no se privaron de suero, hormonas y antibióticos antes de ser utilizadas. Las incubaciones con los distintos compuestos y sus correspondientes controles se llevaron a cabo durante los tiempos indicados. Las condiciones particulares de cada experimento se describirán en el correspondiente apartado de **Resultados**.

3.6 INFECCIÓN DE LOS HEPATOCITOS EN CULTIVO PRIMARIO CON VECTORES ADENOVIRALES

Los vectores adenovirales empleados para sobreexpresar la proteína UCP2 (Ad-UCP2) o la proteína control β -galactosidasa (Ad- β gal) en hepatocitos de rata en cultivo primario, fueron amablemente cedidos por la Dra. Fátima Bosch (CBATEG, Universidad Autónoma de Barcelona). Los vectores virales pertenecían al serotipo V y carecían de su porción E1 del genoma, la cual fue sustituida por los cDNAs que codificaban por las proteínas de interés (UCP2 o β -galactosidasa). Esta sustitución en el genoma viral permitía, de un lado, la sobreexpresión de la proteína UCP2 o de la proteína control β -galactosidasa en las células infectadas, y de otro que estos adenovirus modificados y defectivos no fueran capaces de replicarse y de generar de nuevo partículas infecciosas, tras infectar las células diana.

3.6.1 Determinación de la multiplicidad de infección óptima

Previamente a la infección de los hepatocitos de rata en cultivo primario con el vector adenoviral que sobreexpresaban el cDNA de la UCP2, nos propusimos determinar la cantidad de partículas adenovirales infectivas que debíamos emplear por hepatocito en cultivo -o lo que es lo mismo la multiplicidad de infección (MOI)- necesaria para obtener la máxima expresión de dicho cDNA, sin afectar la viabilidad de las células cultivadas. Para ello, los hepatocitos aislados se sembraron en placas de cultivo de 3 cm de diámetro con medio Earle 199, suplementado con BSA 0,1%, suero bovino fetal al 10%, triiodotironina 1 μ M, dexametasona 1 μ M, antibióticos (Unicilina 100 U/ml; estreptomycin 100 μ g/ml). Todo el proceso de manipulación se realizó en condiciones de esterilidad bajo una campana de flujo laminar. Transcurridas 4 horas después de la siembra, el medio de cultivo se retiró de las placas de cultivo

con el fin de eliminar las células no adheridas a la superficie de la placa, siendo sustituido de nuevo por medio Earle-199, que en este caso contenía los mismos suplementos antes citados a excepción del suero bovino fetal al 10%. Inmediatamente después, los hepatocitos se infectaron con el vector adenoviral que sobreexpresaba la β -galactosidasa en una proporción de 10, 50 y 100 partículas infecciosas (pfu)/hepatocito en cultivo. Dos horas después de la infección, las monocapas celulares se lavaron 2 veces con medio Earle 199, con objeto de retirar las partículas adenovirales no incorporadas a las células. A continuación, las monocapas celulares fueron cultivadas durante 15 horas más en presencia de medio Earle 199 suplementado con BSA, hormonas, antibióticos y suero bovino fetal al 10%, tal como antes se ha descrito. Quince horas de cultivo es tiempo suficiente para permitir que se exprese adecuadamente la β -galactosidasa. Pasado este tiempo, se eliminó el medio de cultivo y las monocapas celulares se trataron sucesivamente con una solución que contenía formaldehído al 2 % y glutaraldehído al 2 % en PBS 1X, durante 5 min, a temperatura ambiente, y posteriormente con otra solución que contenía ferricianuro potásico 4 mM, X-gal (5-Bromo-4-Cloro-3-Indolil- β -D-galactopiranosido) 0.4 mg/ml y $MgCl_2$ 2 mM, en PBS a 37 °C, durante 30 min. Esta última solución contenía un derivado sintético de galactosa, el X-gal, que es transformado por la actividad beta-galactosidasa, expresada por el Ad- β gal, en un precipitado azul que permite determinar cuantitativamente la eficacia de la infección de los hepatocitos en cultivo. Una vez finalizado este último tratamiento, los hepatocitos en cultivo fueron lavados 2 veces con PBS. A continuación y con la ayuda de un microscopio óptico, se analizaron distintos campos en las monocapas celulares tratadas como se indicó anteriormente, y se cuantificó el número de células teñidas de azul. Finalmente, se seleccionó la MOI óptima, aquella que diera un mayor número de células teñidas de azul y un menor número de células muertas no adheridas a la placa.

3.6.2 Procedimiento de infección de los hepatocitos de rata en cultivo primario

La elección de la MOI óptima no sólo nos permitió determinar que ésta era de 50 partículas infecciosas (pfu)/hepatocito en cultivo, sino que nos facilitó también la optimización de las condiciones para la infección de las células en cultivo con vectores adenovirales. De hecho, las condiciones de cultivo e infección de los hepatocitos que se emplearon con los adenovirus -Ad-UCP2 y Ad- β gal- fueron las mismas que las

descritas anteriormente. No obstante, cuando fue necesario disponer de un número de células suficiente para llevar a cabo los estudios que nos planteamos, la sobreexpresión de UCP2 o del control β -galactosidasa se llevó a cabo en hepatocitos cultivados en placas de 6 ó 10 cm de diámetro.

3.7 ANÁLISIS DEL DNA POR LA TÉCNICA DE “SOUTHERN BLOT”

El DNA genómico se obtuvo a partir de la cola de los ratones transgénicos y controles, incubadas con 0,5 ml de buffer de lisis (Tris 0,1 M pH 8,0, EDTA 5 mM, NaCl 0,2 M, SDS 0,2 % y proteinasa K 100 μ g/ ml añadida justo antes de su uso). A continuación, las muestras se incubaron, a 55 °C, durante un mínimo de 2 horas en un agitador térmico a 1000 rpm. Luego, las muestras se centrifugaron durante 15 minutos a 13.000 rpm, a 4 °C. Posteriormente, se recogió el sobrenadante y se le añadió un volumen de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25/24/1; v/v/v), las soluciones resultantes se mezclaron por inversión y se centrifugaron de nuevo a 13.000 rpm, a 4°C, durante 5 minutos, recuperándose a continuación la fase acuosa. Este paso se repitió una vez más, para aumentar la pureza del DNA. Tras esto, se añadió un volumen de isopropanol y las muestras resultantes se agitaron en un agitador de balanceo hasta la aparición de un precipitado de DNA blanco. El DNA precipitado se recogió con la punta de una pipeta de plástico y se transfirió a un tubo de Eppendorf que contenía 0,5 ml de etanol al 70 % (v/v). Las muestras así obtenidas se centrifugaron a 13000 rpm durante 15 minutos. El etanol se eliminó por aspiración y por último se resuspendieron las muestras en 50 μ l de agua bidestilada (Laird et al. 1991). La concentración de DNA obtenido y su grado de pureza se calculó midiendo la absorbancia a 260 nm y la relación de absorbancias 260/280, respectivamente.

El DNA así aislado fue analizado mediante la técnica de Southern blot. Para ello, las muestras de DNA fueron digeridas con Pvu II y se separaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1 % (15 μ g/muestra). Posteriormente, el gel se mantuvo en solución de desnaturalización (1.5 M NaCl/ 0.5 M NaOH) durante 45 min, después otros 45 min en solución de neutralización (1M Tris/ 1.5M NaCl, pH 7.4), y 20 min más en SSC 10X (SSC 1X equivale a 150 mM NaCl, 15 mM citrato sódico, pH 7,2). A continuación, las muestras de DNA digeridas y separadas electroforéticamente se transfirieron a una membrana de nylon empleando SSC 10X y se fijaron covalentemente a la misma mediante exposición a la luz UV. Las prehibridaciones se realizaron durante al menos 5 horas, a 42 °C, con la siguiente solución: formamida 50%, SSC 6 X, Denhardt's 5 X

(BSA 0,1%, ficoll 400 0,1% y polyvinylpyrrolidone 0,1% según sigma), SDS 0,5% y 100 µg/ml de DNA procedente de espermatozoides de salmón. Tras esto, las membranas se hibridaron con la misma solución de prehibridación, durante al menos 14 horas, con una sonda de 208 bases del cDNA que codifica por la UCP2 humana, previamente marcada con [$\alpha^{32}\text{P}$]dCTP por el método del "random-priming". Transcurrido este tiempo, las membranas se lavaron dos veces durante 20 minutos, a 42 °C, con una solución que contenía SSC 0.1X y SDS 0.1%. Tras la exposición de las membranas con una película de rayos-X y a -80 °C, la intensidad de las señales radioactivas resultantes fue determinada por análisis densitométrico de alta resolución.

3.8 ANÁLISIS DE LOS NIVELES DE RNA MENSAJERO POR LA TÉCNICA DE "NORTHERN BLOT"

El RNA total del hígado de ratones se extrajo utilizando el kit "Ultraspec" (Biotecx) mientras que el procedente de los hepatocitos en cultivo fue extraído por el método descrito por Chomczynski y Sacchi (Chomczynski and Sacchi 1987). Para esto último, las monocapas celulares fueron lavadas 2 veces con PBS, a 4 °C, y se homogeneizaron añadiendo 2 ml de una solución que contenía tiocianato de guanidina 4M, citrato sódico 25 mM, N-lauril-sarcosina 0,5 % (p/v) y β -mercaptoetanol 100 mM, a pH 7,0. El homogeneizado resultante se recogió en tubos de Eppendorf de 2 ml, a los que se añadieron sucesivamente 1/4 (v/v) de Cl_3CH /alcohol isoamílico (49/1; v/v) y 1/12 (v/v) de acetato sódico 2 M pH 4,0. A continuación, se adicionó un volumen de fenol saturado en agua (pH<7,0) y se agitó vigorosamente en un vórtex durante 15 segundos; la mezcla resultante se centrifugó (15 min, 15.000 x g, a 4 °C). Tras la centrifugación, se recogió la fase acuosa (superior) en otro tubo de Eppendorf que contenía 1 volumen de isopropanol. Tras mezclar por inversión, las mezclas resultantes se mantuvieron a -20 °C al menos durante una noche. Transcurrido este tiempo, las muestras se centrifugaron a 15.000 g, durante 15 minutos y a una temperatura de 4 °C. El precipitado obtenido fue tratado con 300 µl de etanol al 75% y se volvió a centrifugar en las mismas condiciones. Los precipitados resultantes se resuspendieron en 15 µl de agua bidestilada estéril, previamente tratada con dietil pirocarbonato 0,001% (v/v). La concentración de RNA total se calculó midiendo la absorbancia a 260 nm, mientras que su integridad y pureza se determinó midiendo la razón entre los valores de absorbancia a 260 nm y 280 nm (1,7-2).

El RNA total, una vez cuantificado, se trató con formaldehído al 7,8 % y formamida al 50%, a 65 °C durante 20 minutos, con el fin de desnaturalizarlo y mantenerlo en estas condiciones. A continuación, las muestras de RNA total (20 µg de RNA total/ por muestra) se sometieron a electroforesis en geles de agarosa al 1,3%, que contenían formaldehído 3 M y tampón MOPS (MOPS 40 mM, acetato sódico 10 mM, EDTA 2 mM, pH 7). Este tampón MOPS fue el utilizado en la electroforesis. Una vez finalizada la electroforesis, el RNA se transfirió a membranas de nylon empleando como tampón de transferencia el SSC 10X. Finalmente, las membranas resultantes se trataron con luz UV para fijar el RNA covalentemente a las mismas.

La prehibridación de las membranas así obtenidas se llevó a cabo durante al menos 6 horas, a 42 °C, con una solución que contenía: 50% formamida, NaCl 0,25 M, Na₂HPO₄ 0,1 M, SDS 7% (p/v) y 100 µg/ml de DNA de esperma de salmón, a pH 7,2. A continuación las membranas se hibridaron con las correspondientes sondas de DNA marcadas con [α^{32} P]-dCTP, disueltas en la misma solución empleada para la prehibridación. Transcurridas 12-15 horas, las membranas se lavaron sucesivamente con SDS 0,1% (p/v) en SSC 0,1x, a una temperatura de 25 °C, durante 5 minutos, y posteriormente a 42 °C, durante 15 minutos. Los filtros hibridados y lavados, se expusieron con películas de rayos X, a -80 °C, el tiempo necesario en cada caso. Las señales radioactivas obtenidas se cuantificaron densitometrando las películas expuestas. En cada experimento, los valores densitométricos para cada mensajero (en cada carril) fueron normalizados con su correspondiente señal radioactiva obtenida para el rRNA 18S (mRNA/18S rRNA).

Las sondas de DNA utilizadas para las hibridaciones fueron las siguientes: 1); un fragmento EcoRI de 1,1 Kb que incluye el cDNA completo que codifica por la UCP2 humano; 2) un fragmento EcoRI de 5 Kpb del DNA que codifica por el 18S rRNA humano (Torczynski et al. 1985).

3.9 DETECCIÓN DE PROTEÍNAS POR LA TÉCNICA DE “WESTERN BLOT”

En los experimentos destinados a la obtención de muestras para análisis por la técnica de *Western blot*, las mitocondrias, aisladas como se describe posteriormente, fueron tratadas con una solución que contenía: HEPES 50mM pH 7,4, Na₄P₂O₇ 10 mM, NaF 100 mM, EDTA 10 mM, Tritón X-100 1%, aprotinina 10 µg/ml, leupeptina 5 µg/ml, benzamidina 2 mM, Na₃VO₄ 1mM y PMSF 2 mM.

A continuación, se ajustó la proteína de las mitocondrias a una concentración de 3 mg/ml con medio de resuspensión, y las muestras se desnaturalizaron mediante la adición de tampón Laemli 5X (β mercaptoetanol 0,72 M, azul de bromofenol saturado en agua, $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 0,05 M, glicerol 34,8 %, SDS 10 %) hasta alcanzar una concentración final 1X del mismo, y el posterior tratamiento de estas muestras a 100 °C, durante 3 minutos.

Después, los extractos de proteína mitocondrial resultantes se separaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE), cargándose 36 μg de proteína total por cada pocillo. Tras la electroforesis, las muestras se transfirieron a filtros de PVDF. A continuación, las membranas se bloquearon durante 1 hora con solución de bloqueo (leche desnatada 5 %, Tween 20 0,05%, NaCl 150 mM, Tris 20 mM, pH 7,4) y se incubaron durante 12 horas con el correspondiente anticuerpo primario, a 4 °C. Posteriormente, se lavaron durante 20 min con TTBS (Tween 20 0,05%, NaCl 150 mM, Tris 20 mM; pH 7,4) y se incubaron durante 1 hora con el correspondiente anticuerpo secundario conjugado con la peroxidasa en solución de bloqueo. A continuación, se lavaron con TTBS durante 20 min y con TBS 1X (150 mM NaCl, 20 mM Tris, pH 7,4), durante 5 minutos.

Por último se incubaron las membranas 1 min con el reactivo ECL ("Enhanced Chemiluminiscence"), y la señal se obtuvo mediante la exposición de las membranas a una película de rayos X a temperatura ambiente.

3.10 AISLAMIENTO DE MITOCONDRIAS

Las mitocondrias se obtuvieron de hígado de ratones transgénicos y controles ayunados 24 ó 48 h, así como de hepatocitos en cultivo tratados o no con adenovirus. Para el aislamiento de las mitocondrias hepáticas, los ratones controles y transgénicos fueron anestesiados con ketamina/rompún (150 mg/ 10 mg por kg peso, inyectada por vía intraperitoneal). Tras la apertura del abdomen el hígado fue extraído y homogeneizado en la proporción 1/2 (peso/volumen), en un medio que contenía manitol 0,2 M, sacarosa 50 mM, EGTA 1 mM, HEPES 5 mM pH 7,4, BSA sin ácidos grasos 0,1%, ajustado todo a pH 7,4. La homogeneización se llevó a cabo, utilizando un homogenizador de vidrio con 6 golpes a 500-1000 rpm, con vástago también de vidrio, a 4 °C.

La homogeneización de las monocapas celulares se llevó a cabo tras ser lavadas dos veces con PBS a 4 °C, en las mismas condiciones que las descritas, aunque en

este caso la proporción células/volumen de medio de homogeneización fue de unos 7,8 millones de células en 2 ml.

Los homogeneizados así obtenidos se centrifugaron a 1000 x g durante 10 min; el sobrenadante resultante se centrifugó a 10.000 x g durante otros 10 minutos y el pellet de mitocondrias obtenido se resuspendió en 250 µl de medio de resuspensión (manitol 0.2 M, sacarosa 50 mM, HEPES 20 mM, BSA sin ácidos grasos 0.1%, ajustado todo a pH 7,4).

3.11 MEDIDA DEL CONSUMO DE O₂ Y DEL POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL

El consumo de oxígeno y el potencial de membrana mitocondrial se midieron simultáneamente en mitocondrias aisladas, obtenidas de hígado de ratones transgénicos y controles, así como de hepatocitos cultivados, usando el electrodo de Clark y la sonda fluorescente rodamina-123 (Scaduto and Grotyohann 1999).

Alícuotas de la suspensión mitocondrial (0,5 mg de proteína /ml) se adicionaron a un medio de respiración conteniendo KCl 120 mM, sacarosa 20 mM, KH₂PO₄ 10 mM, HEPES 5 mM, MgCl₂ 2 mM, EGTA 1mM y BSA 0,1%, a pH 7,2. A continuación, se añadió rotenona 5µM, succinato 10 mM y rodamina-123 1 µM. Posteriormente se añadieron las siguientes variables: ADP 180 µM, GDP 0,5 mM y FCCP 2 µM. Los experimentos con GDP se realizaron tras una preincubación durante 4 minutos con este compuesto. A los 8 minutos de incubación y tras la medición del consumo de O₂ se centrifugó la mezcla de reacción (13.000 rpm durante 25 segundos) de cada ensayo, con el fin de obtener un precipitado de mitocondrias, que se utilizó para la posterior medición de la fluorescencia de la rodamina 123 en un espectrofluorímetro (longitud de onda de excitación 520 nm; longitud de onda de emisión 580 nm). Para confirmar que la captación de rodamina-123 está relacionada con el potencial de membrana se realizaron experimentos usando FCCP como agente desacoplador, en presencia o ausencia de GDP. Durante todos estos ensayos, las mitocondrias aisladas se mantuvieron en hielo, a 4 °C, y se usaron sin problema alguno durante, al menos, las 4 horas siguientes después de su aislamiento.

3.12 CURVA DE TOLERANCIA A LA GLUCOSA

La curva de tolerancia a la glucosa es una prueba funcional que tiene como objeto analizar la capacidad de los ratones controles y transgénicos de metabolizar glucosa, tras una sobrecarga de este azúcar (1 mg/g peso ratón).

Inicialmente se determinó la glucemia basal en los ratones transgénicos y sus respectivos controles, todos ayunados durante 24 horas. Dichas determinaciones se realizaron en muestras sanguíneas obtenidas de la cola de estos animales, con la ayuda de un medidor de glucosa en sangre (Glucometer Elite™ de Bayer). Seguidamente, se inyectó glucosa intraperitonealmente (1 mg/g peso corporal) y se determinó la concentración de glucosa en muestras de sangre obtenidas de la cola, a diferentes tiempos (30, 60, 90, 120 minutos).

3.13 CURVA DE TOLERANCIA A LA INSULINA

El test de tolerancia a insulina es una prueba funcional, que tiene como objeto analizar la capacidad de los ratones controles y transgénicos de disminuir la concentración de glucosa en sangre tras la administración de insulina exógena (0.75 U/kg peso corporal).

De ratones normalmente alimentados se extrajo sangre de la cola para determinar la glucemia basal, a las 10 horas a.m. Posteriormente, se les inyectó insulina intraperitonealmente (0.75 U/kg peso vivo) y se determinó la concentración de glucosa (Glucometer Elite™ de Bayer) a diferentes tiempos (15, 30, 45, 60, 90 minutos, tras la administración de insulina) en muestras de sangre obtenidas de la cola.

3.14 DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS SÉRICOS

Para la obtención del suero se extrajo sangre del seno retroorbitario de animales controles y transgénicos ayunados 24 horas o normalmente alimentados. La sangre así extraída se mantuvo a 4 °C, durante 30 minutos, con objeto de que coagulara. A continuación el coágulo se separó mediante centrifugación a 11.000 x g durante 20 minutos, a 4 °C. El suero sobrenadante obtenido se puso en criotubos que se mantuvieron congelados a -80 °C, hasta el momento de la determinación de los diferentes parámetros séricos.

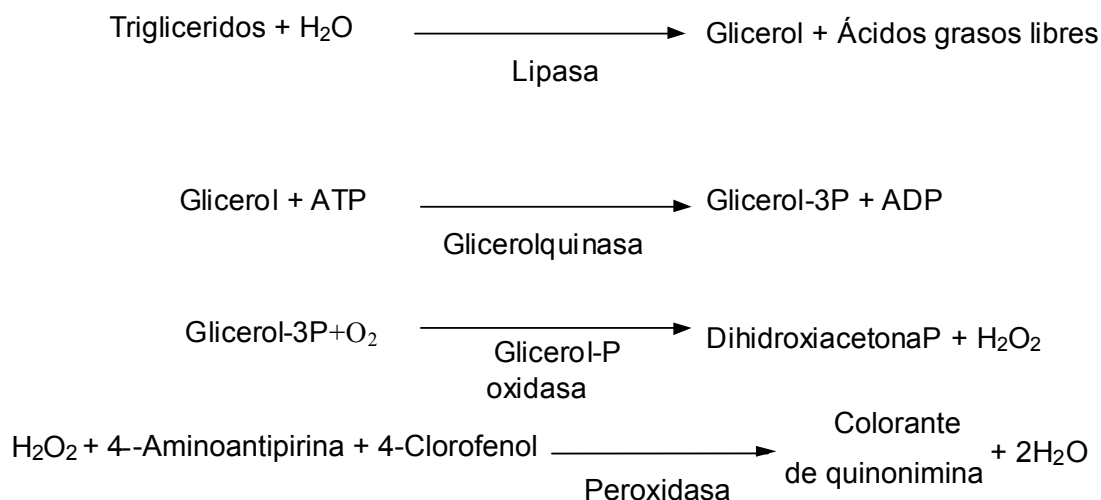
3.14.1 Glucosa

La concentración de glucosa en sangre se determinó con ayuda de un medidor de glucosa (Glucometer Elite™ de Bayer), cuyas tiras reactivas (Glucosa oxidasa, Ferricianuro potásico) reaccionan con la glucosa presente en la sangre. Así, una gota de sangre de la vena caudal de los animales pasa a la cámara de reacción por capilaridad y reacciona con la glucosa oxidasa y el ferricianuro potásico, generándose electrones que producen una corriente proporcional a la concentración de glucosa en la muestra. Después de unos segundos, aparece en el medidor la lectura con el valor de glucosa en sangre (mg/dl).

Los valores de la concentración de glucosa en sangre proporcionados por el Glucometer se sitúan entre 20 y 600 mg/dl (1,1-33,3 mmol/l)

3.14.2 Triglicéridos

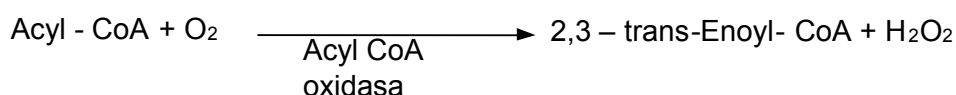
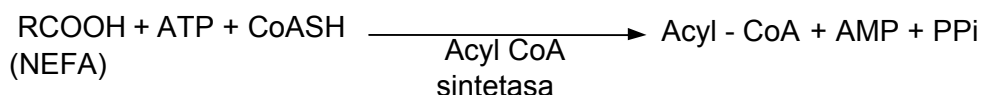
Los triglicéridos séricos se determinaron mediante un kit comercial (Thermo Trace), que se basa en la cuantificación de un cromógeno obtenido tras el acoplamiento de las siguientes reacciones:



Así, a cada pocillo de una placa de 96 pocillos se adicionaron 5 µl de suero de ratones controles o transgénicos ayunados 24 horas o 5 µl del calibrador del kit. Inmediatamente después se añadieron 300 µl de la solución del kit Thermo Trace y se atemperó la placa 5 min en el Spectramax. A continuación, se midió la absorbancia a 500 nm proporcional a la cantidad de triglicéridos presentes en la muestra. Estos valores de absorbancia se corrigieron con el calibrador del kit.

3.14.3 Ácidos grasos no esterificados (NEFAs)

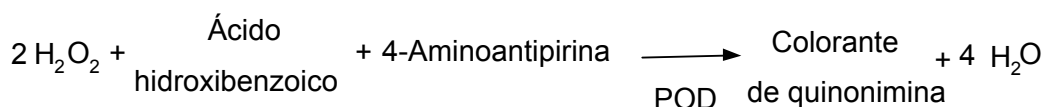
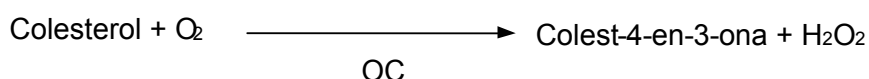
La determinación de los ácidos grasos no esterificados en suero se realizó mediante un kit comercial (NEFA C, Wako Chemicals) que se basa en la cuantificación de un cromógeno obtenido tras el acoplamiento de las siguientes reacciones:



A 12,5 µl de suero de ratones controles o transgénicos ayunados 24 horas, se añadieron 250 µl del llamado reactivo A. Esta mezcla se incubó 10 min a 37 °C. Tras este tiempo añadimos 500 µl del reactivo B e incubamos las muestras otros 10 min, a 37 °C. Finalmente agitamos por inversión y medimos la absorbancia a 550 nm. Los valores obtenidos fueron corregidos con la solución estándar del kit NEFA C, que contenía ácido oleico.

3.14.4 Colesterol

Los niveles de colesterol sérico se determinaron mediante el reactivo de colesterol INFINITY™ de la firma comercial Sigma Diagnostics. Este reactivo está basado en la cuantificación de un cromóforo (colorante de quinonimina) obtenido tras el acoplamiento de tres reacciones en las que intervienen la esterasa de colesterol (EC) la oxidasa de colesterol (OC) y la peroxidasa (POD):



Para ello, utilizamos 5 µl del suero de ratones controles o transgénicos ayunados 24 horas o 5 µl del calibrador y adicionamos 300 µl del reactivo de colesterol INFINITY™; esta mezcla la incubamos 10 min a 37°C. Finalmente agitamos por inversión y medimos la absorbancia a 500 nm. Para el cálculo de las concentraciones de colesterol, los valores de absorbancia obtenidos son corregidos con el calibrador de colesterol de Sigma Diagnostic.(Catálogo # 0284)

3.14.5 Insulina

La determinación de los niveles de insulina en suero de ratones alimentados se realizó mediante el kit de Cristal Chem Inc. (Catálogo # INSKR020).

Este kit es un enzima-inmunoensayo según el cual dos anticuerpos monoclonales se dirigen contra diferentes determinantes antigénicos de la insulina. Durante la incubación, la insulina de la muestra reacciona con los anticuerpos anti-insulina conjugados con peroxidasa y anticuerpos anti-insulina ligados al pocillo de microtitulación. El anticuerpo marcado con enzima no unido se elimina con un simple lavado. El enzima conjugado unido se detecta por reacción con el sustrato o-phenylenediamina (OPD). Finalmente, la reacción se para añadiendo ácido para dar un punto fijo colorimétrico que se lee por espectrofotometría.

La concentración de insulina se calcula a partir de la curva de calibración del kit.

3.15 VALORACIÓN DE METABOLITOS

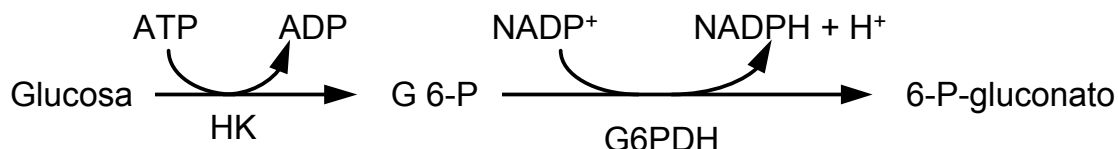
3.15.1 Nucleótidos de adenina

Para valorar la concentración de nucleótidos de adenina en hepatocitos en cultivo las células se homogeneizaron en una solución de HClO₄ al 5 %, y empleando el Politrón durante 30 segundos. A continuación, los homogeneizados resultantes se centrifugaron a 4.500 rpm durante 15 min, y a 4 °C. Seguidamente, los sobrenadantes resultantes se neutralizaron con imidazol 0,3 M /K₂CO₃ 3 M y se centrifugaron una segunda vez a 13.000 rpm durante 10 min, a 4 °C. Finalmente, se valoraron los niveles de ATP, ADP y AMP en los sobrenadantes desproteinizados así obtenidos.

Para los experimentos *in vivo*, los ratones fueron ayunados y anestesiados con Ketamina/Rompún (150 mg/10 mg por Kg de peso) vía intraperitoneal. El hígado fue extraído por *freeze clamp* utilizando unas pinzas de Wollenberg y posteriormente se

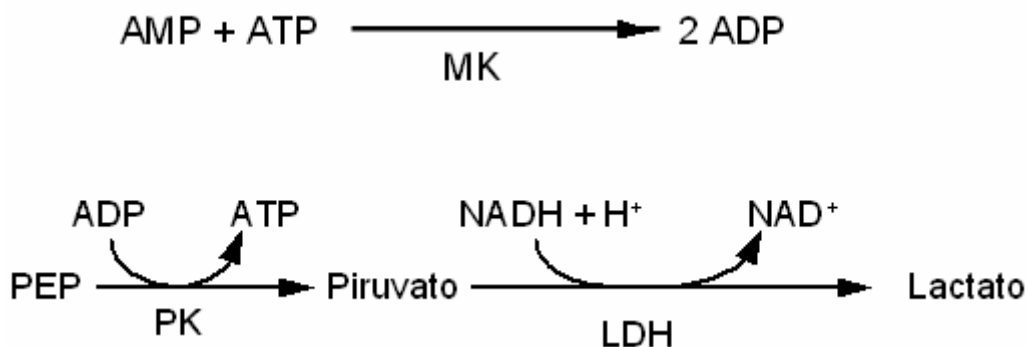
pulverizó con N₂ líquido en un mortero de cerámica. La desproteización de las muestras se realizó con HClO₄ al 5,5 % siendo el resto del procedimiento igual al del procesamiento de las muestras celulares.

El ATP se determinó espectrofotométricamente siguiendo el método descrito por Lamprecht y col. (Lamprecht W 1974), basado en la producción de NADPH según las siguientes reacciones acopladas:



La mezcla de ensayo tenía un volumen final de 1 ml y estaba compuesta por glicilglicina 50 mM, MgCl₂ 10 mM, KCl 100 mM, glucosa 4 mM, NADP⁺ 5 mM, 2 U/ml de glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) y la muestra, a pH 7,4. La reacción se inició con la adición de 2 U de hexoquinasa (HK) y se registró el incremento de absorbancia provocado a 340 nm.

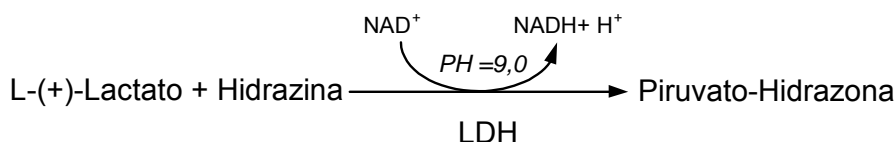
El ADP y el AMP se midieron fluorimétricamente por el método descrito por Adam y col (Adam H 1965) según las siguientes reacciones:



En este caso la mezcla de ensayo estaba compuesta por glicilglicina 50 mM, MgCl₂ 10 mM, KCl 100 mM, PEP 2 mM, NADH 0,18 mM, 4 U/ml de lactato deshidrogenasa (LDH) y la muestra, en un volumen final de 1 ml y a pH 7,4. La reacción se inició con la adición de 4 U de piruvato quinasa (PK) y la disminución de la absorbancia producida a 340 nm se correspondió con la cantidad de ADP presente en la muestra. A continuación se añadieron ATP 1 mM y 4 U de mioquinasa (MK) y en este caso la disminución de la absorbancia se correspondió con la cantidad de AMP. Todos los ensayos se realizaron a 37 °C.

3.15.2 Lactato

La valoración de los niveles de lactato presentes en el medio de cultivo se realizó según el método descrito por Hohorst y col (Hohorst 1965), que se basa en el registro espectrofotométrico del aumento de la formación de NADH que resulta en la reacción de conversión de L-lactato a piruvato por la lactato deshidrogenasa.



El equilibrio de esta reacción está muy desplazado hacia la formación de L-lactato, de manera que para la oxidación cuantitativa de L-lactato, los productos de la reacción deben eliminarse del medio. Así los protones son atrapados por el medio de reacción alcalino (pH = 9,0) y el piruvato se asocia con la hidrazina formándose piruvato-hidrazona.

La mezcla de reacción, en un volumen final de 1 ml, contenía: sulfato de hidrazina 0,3 M, glicina 0,75 M, EDTA 3,75 mM y NAD^+ 2,5 mM, a pH 9,0. Cuando se añadió la muestra (medio de incubación de los hepatocitos en cultivo, previamente desproteneizado y neutralizado), se esperó a que se estabilizara la absorbancia a 340 nm, a continuación se añadió la LDH (20 U/ml) y se registró el incremento de la absorbancia a 340 nm, tras 20 minutos de reacción a 25 °C.

3.15.3 Formación de $^{14}\text{CO}_2$

En los estudios de oxidación de glucosa a CO_2 , los hepatocitos aislados fueron sembrados ($\sim 2,5 \times 10^6$ células) en botellas de cultivo tisular de plástico ("flasks"), que podían ser cerradas herméticamente con tapones de goma y se cultivaron en medio Earle 199, suplementado con BSA 0,1%, suero bovino fetal al 10%, triiodotironina 1 μM , dexametasona 1 μM , antibióticos (Unicilina 100 U/ml; estreptomicina 100 $\mu\text{g/ml}$) y glucosa hasta alcanzar una concentración final de 10 mM. Tras mantener los cultivos celulares en estas condiciones durante 19 horas, las células fueron privadas de suero fetal, hormonas y antibióticos durante otras 2 horas.

Después de este tiempo, se retiró el medio de cultivo y la monocapa celular se lavó dos veces con Krebs-Henseleit suplementado con glucosa 10 mM y HEPES 20 mM. Posteriormente, las células se preincubaron con 2,5 ml de este mismo medio durante 30 minutos. Tras la preincubación, se añadió $[\text{U-}^{14}\text{C}]$ glucosa hasta 20 mM (0,013 $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$) cerrando herméticamente las botellas. Este momento fue

considerado como tiempo 0 de la incubación. Transcurridas 4 horas desde la adición de la glucosa radioactiva a los hepatocitos en cultivo, se añadió HClO_4 al medio de incubación a través de los tapones de goma, hasta alcanzar una concentración final del 5%. Inmediatamente después, se inyectó a través del tapón 1 ml de hidróxido de hiamina, que quedó retenida en un tubo de Eppendorf que –bien sujeto- previamente había sido colocado dentro del “flask” de cultivo. El CO_2 liberado era capturado por el hidróxido de hiamina.

Después de 1 hora a 4 °C, el $^{14}\text{CO}_2$ generado y retenido por el hidróxido de hiamina se midió en alícuotas de 0,4 ml por duplicado en un contador de centelleo líquido. Las incubaciones a tiempo 0 minutos de incubación fueron tratadas de forma similar. (Hue et al. 1975).

3.15.4 Glucógeno

Para la estimación de la incorporación de $[\text{U-}^{14}\text{C}]$ glucosa a $[\text{C-}^{14}]$ glucógeno en hepatocitos aislados de rata se procedió tal y como fue descrito por Mojena y col (Mojena et al. 1989).

Para ello, los hepatocitos fueron sembrados ($\sim 7.8 \times 10^6$ células) en placas de 10 cm de diámetro y cultivados como en los estudios de oxidación de glucosa a CO_2 hasta el momento de la adición de la glucosa radiactiva. Así, tras 1 hora de incubación de los hepatocitos con el precursor glucogénico ($[\text{U-}^{14}\text{C}]$ -glucosa), las monocapas celulares se homogeneizaron con 0,7 ml de KOH 10% y seguidamente se incubaron a 80 °C, durante 20 minutos. A continuación se añadió glucógeno frío hasta que la concentración final de éste fue del 10%; 0,2 ml de esta mezcla (por duplicado) se depositaron sobre filtros de papel Whatman ET-31 (2,5 x 2,5 cm). Posteriormente, los filtros se lavaron 3 veces con etanol al 66%, para eliminar las trazas de $[\text{C-}^{14}]$ -glucosa, mientras que en estas condiciones el glucógeno se mantiene retenido en los filtros. La cantidad de $[\text{C-}^{14}]$ -glucógeno producido se determinó mediante el conteo de los filtros con 5 ml de líquido de centelleo, en un contador de radiación beta. Por último, los valores así obtenidos se corrigieron por la actividad específica de la glucosa estimada al tiempo 0 minutos de incubación.

3.16 ENSAYO DE LA GLUCONEOGÉNESIS EN HEPATOCITOS EN CULTIVO PRIMARIO

La gluconeogénesis se ensayó como la conversión de $[U-^{14}C]$ lactato en $[^{14}C]$ glucosa, según el método descrito por Monge y col. (Monge et al. 1986). Para ello, los hepatocitos aislados se sembraron en placas de cultivo ($\sim 2,0 \times 10^6$ células, equivalente a 0,7 mg de proteína total, en placas de 3 cm de diámetro) y se cultivaron en medio Earle 199, suplementado con BSA 0,1%, suero bovino fetal al 10%, triiodotironina 1 μ M, dexametasona 1 μ M y antibióticos (penicilina 100 U/ml; estreptomycin 100 μ g/ml). Tras mantener los cultivos celulares en estas condiciones durante 19 horas, las células fueron deprivadas de suero fetal, hormonas y antibióticos durante 2 horas más.

Tras este tiempo, se retiró el medio de cultivo y la monocapa celular se lavó dos veces con Krebs-Henseleit suplementado con glucosa 10 mM y HEPES 20 mM, a pH 7,35. Posteriormente, las monocapas celulares de hepatocitos se preincubaron con 1,1 ml de este mismo medio durante 10 minutos. Tras la preincubación, se añadió la mezcla de precursores gluconeogénicos $[U-^{14}C]$ lactato/piruvato (10/1 mM; 0,2 μ Ci/ μ mol). Este momento fue considerado como tiempo 0 de la incubación. Transcurridas 4 horas desde la adición de los precursores gluconeogénicos al medio de incubación, se tomaron alícuotas de 0,5 ml por duplicado de dicho medio, que se llevaron a tubos en hielo que contenían 2 ml de una solución de glucosa 0,70 M/NaCl 0,45%, y se centrifugaron a 3000 rpm, durante 1 minuto, a temperatura ambiente. Los sobrenadantes resultantes fueron tratados sucesivamente con 0,5 ml de $ZnSO_4$ 0,15 M y 0,540 ml de $Ba(OH)_2$ 0,15 M. Tras este tratamiento, las muestras se centrifugaron a 3000 rpm, durante 15 minutos, con el fin de eliminar el precipitado de $BaSO_4$ obtenido. Posteriormente, alícuotas de 1,6 ml de los sobrenadantes se incubaron, durante 30 minutos, con 0,4 g (peso húmedo) de una resina de intercambio iónico mixto Bio-Rad AG 501-X8(D), a temperatura ambiente y con agitación (150 ciclos/minuto), con la finalidad de que el $[U-^{14}C]$ lactato que no se hubiera convertido en glucosa y otros aniones (intermediarios metabólicos) queden retenidos en la resina. Finalmente, la $[^{14}C]$ glucosa generada se midió en alícuotas de 1 ml del eluido en un contador de centelleo líquido.

Los controles para evaluar la eficacia de la resina en la retención de aniones y en la recuperación de glucosa radioactiva, se realizaron midiendo la radioactividad obtenida antes y después del tratamiento con la resina de soluciones de $[U-$

^{14}C]lactato/piruvato (10/1 mM; 0,2 $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$) ó $[\text{U-}^{14}\text{C}]$ glucosa 10 mM (1,6 nCi/ μmol), respectivamente, que fueron procesados de igual modo que las alícuotas del medio de incubación celular.

La eficacia de la retención de aniones fue de aproximadamente el 98% y la de la recuperación de ^{14}C]glucosa fue del 55-70%. Para la estimación de la gluconeogénesis, la radioactividad específica del lactato se calculó como el cociente entre la radiactividad obtenida (en dpm/ml) y la concentración real de este metabolito (en $\mu\text{moles/ml}$), medidas a tiempo 0 minutos en alícuotas del medio de incubación de hepatocitos.

3.17 VALORACIÓN DE PROTEÍNAS

La concentración de proteínas se determinó por los métodos de Lowry (Lowry et al. 1951) y Bradford (Bradford 1976), empleándose como patrón seroalbúmina bovina. Según la relación establecida por Hue y col.(Hue et al. 1975), 1 g de células (peso húmedo) equivale a 221 mg de proteína total, medida por el método de Lowry.

3.18 ESTUDIO ESTADÍSTICO

Los valores presentados son la media \pm error estándar de la media (EEM) de los resultados obtenidos de un número n de experimentos. En todos los experimentos las incubaciones y las valoraciones se hicieron por duplicado.

La significación estadística de las diferencias se determinó mediante el test de la *t de Student*, o bien por el análisis de la varianza (ANOVA) para medidas repetidas, seguido por el test de *Tukey-Kramer*, según corresponda. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando el valor de *p* fue menor de 0,05.

RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 DESARROLLO DE UN MODELO DE RATÓN TRANSGÉNICO QUE SOBREEEXPRESA EL GEN UCP2 EN HÍGADO

Con objeto de estudiar la importancia fisiopatológica de la proteína desacoplante UCP2, hemos desarrollado en colaboración con el Centro de Biotecnología Animal y Terapia Génica (CBATEG) de la Universidad Autónoma de Barcelona, un modelo de ratón transgénico que sobreexpresa UCP2 en el hígado.

Para generar dicho modelo animal, se construyó un gen quimérico formado por el promotor del gen de la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK) (fragmento XbaI-BglII de -450 pb a +73 pb) fusionado al cDNA del gen humano de la UCP2, este último cedido por el Prof. J. P. Giacobino (Laboratoire de Recherches Metaboliques, Universidad de Ginebra, Suiza). El mencionado fragmento del promotor de la PEPCK es capaz de promover la expresión de genes exógenos en hígado de animales transgénicos. Además, la expresión de los genes quiméricos que contienen este promotor está regulada de manera similar a como se regula el gen endógeno de la PEPCK. Es decir, el glucagón y los glucocorticoides inducen la expresión del transgén, mientras que la insulina la bloquea (McGrane et al. 1988; Short et al. 1992). Por otro lado, para obtener niveles elevados y estables de mRNA *in vivo* a partir de un cDNA conviene incorporar, tanto 5' como 3' a la secuencia del cDNA, secuencias de splicing y poliadenilación fuertes, con objeto de permitir un correcto procesamiento, corte y poliadenilación de los extremos 5' y 3' del mensajero quimérico. Con este fin, utilizamos los intrones y exones del gen de la β -globina, introduciendo el cDNA de la UCP2 en el segundo exón de la β -globina (sitio de clonación EcoRI) en el vector PEPCK/ β -globina, ya utilizado en otros modelos de animales transgénicos generados en el CBATEG (Bosch et al. 1998).

La obtención de animales transgénicos se llevó a cabo mediante microinyección del gen quimérico PEPCK/UCP2 (fragmento Sac I- Asp 718 de 3,3 Kpb) a óvulos fecundados de ratón. Para ello, 6-8 horas después de la ovulación se recogieron óvulos fecundados de hembras (C57BL6/SJL) superovuladas. A continuación se microinyectaron en el pronúcleo masculino 2 pl de la solución de DNA (4 ng/ μ l) conteniendo el gen quimérico. Los embriones microinyectados se trasplantaron a madres receptoras (CD-1). Tres semanas después del nacimiento, se analizaron los

animales para detectar la presencia del transgén mediante análisis por *Southern blot*. Para ello se trató DNA genómico obtenido de la cola de los ratones con Pvu II, y tras separación electroforética fue hibridado con una sonda radioactiva de 208 bases del cDNA de UCP2 humano. En las muestras obtenidas de ratones transgénicos se observó una banda de 5 Kb correspondiente al gen endógeno, y otra banda de 0,8 Kb que correspondía al transgén. En las muestras obtenidas de ratones controles solo se observó la banda de 5 Kb (**Figura 1**).

De este modo se detectó la presencia del transgén en cinco ratones (animales fundadores F0). Con cada uno de los F0, por retrocruzamiento se estableció una colonia y se determinó el nivel de expresión del transgén en hígado mediante análisis por *Northern Blot* (datos no mostrados). Una de las F0 no transmitió el transgén a la descendencia indicando que se trataba de un animal mosaico, las otras 4 líneas fundadoras fueron efectivas en la transmisión del transgén a su descendencia.

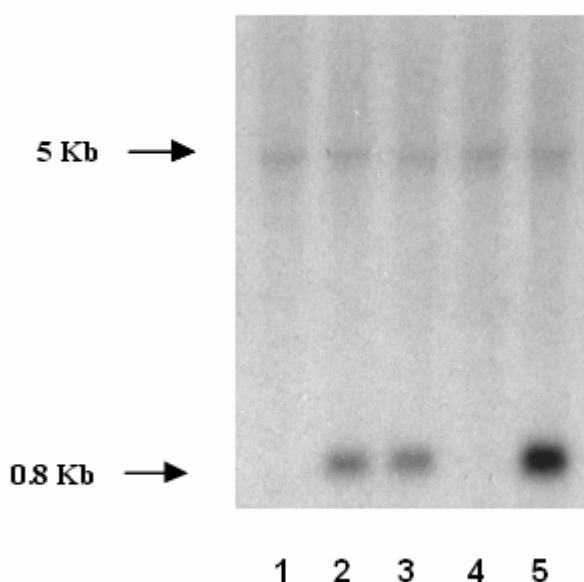


Figura 1.- Caracterización de ratones transgénicos y controles. DNA genómico (15 µg) de diferentes ratones fue digerido con Pvu II, transferido a membranas de nylon e hibridado con una sonda que correspondía al fragmento 421-628 del cDNA de UCP2 humano marcado radiactivamente con [α -32-P]dCTP por cebamiento al azar ("random priming"). En la figura se muestran las señales radiactivas obtenidas correspondientes al gen endógeno (5 Kb) y al transgén (0.8 Kb) para las muestras de ratones controles (carriles 1 y 4), ratones heterocigotos (carriles 2 y 3) y homocigoto (carril 5).

Para estudiar si la presencia del transgén se acompañaba de niveles elevados de mRNA de UCP2 en hígado, se analizaron muestras de mRNA totales de hígado de ratones controles y transgénicos por la técnica de “Northern blot”. Para ello se utilizó una sonda que contiene el cDNA completo de UCP2 humano (fragmento EcoRI 1,1 Kb). En la **Figura 2** se muestra un experimento representativo del estudio realizado con la línea 44. Los resultados obtenidos muestran que la presencia del transgén se correlacionó con un aumento en el contenido de mRNA de UCP2 (1,7 Kb) en hígado de ratones transgénicos. Además, los niveles de mRNA eran significativamente mayores en ratones homocigotos que los obtenidos en ratones heterocigotos. Aunque no se muestra en esta figura las cuatro líneas de transgénicos analizadas expresaban niveles de mRNA de UCP2 en hígado unas seis (Tg1), cuatro (Tg2) y dos (Tg3 y Tg4) veces más que el nivel endógeno de UCP2. Se seleccionaron las líneas Tg1 y Tg2, que pasaron a denominarse líneas 36 y 44.

En este estudio, se presentan los resultados obtenidos en los experimentos realizados utilizando machos heterocigotos, exceptuando los resultados de las Figuras 1, 2 y 3 en los que se utilizaron animales hetero y homocigotos.

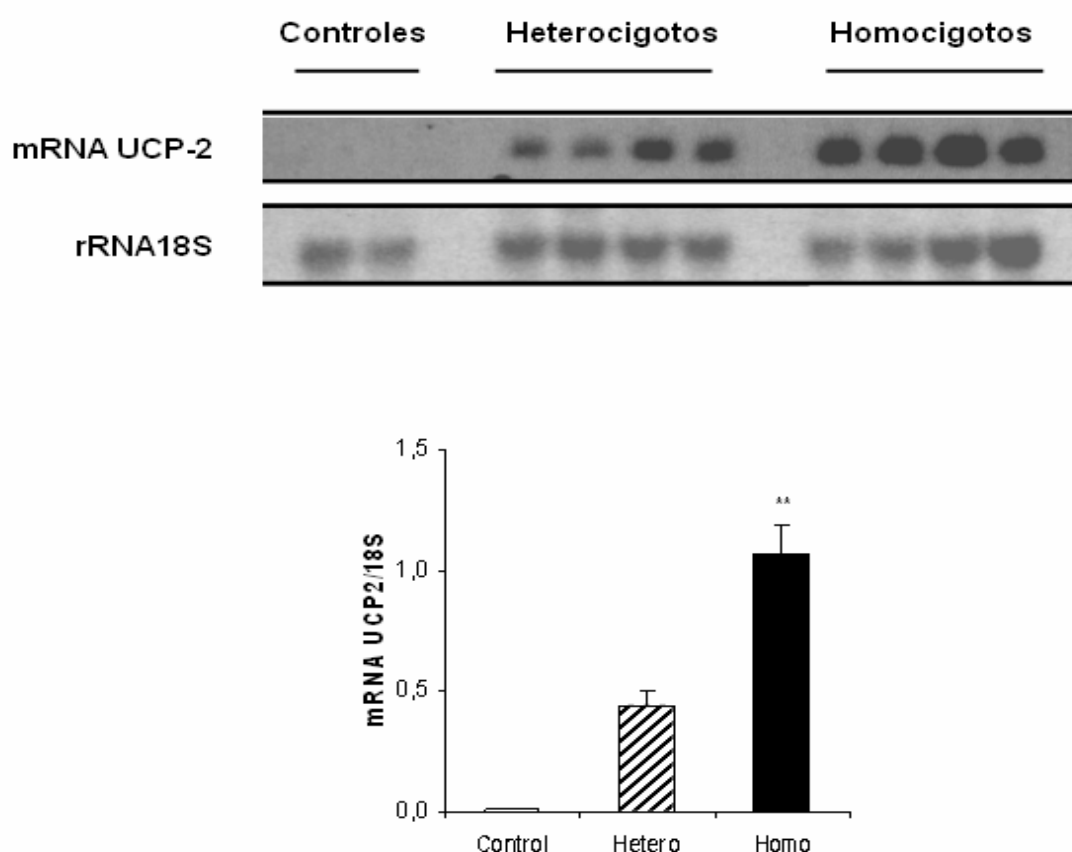


Figura 2.- Determinación de los niveles de mRNA de UCP2 en hígado de ratones controles y transgénicos (línea 44). El RNA total (20 µg/pocillo) se sometió a

electroforesis en geles de agarosa (1,2%) y se transfirió a membranas de nylon. Las hibridaciones se llevaron a cabo usando el cDNA completo de UCP2 marcado radiactivamente con [α -P32]dCTP por cebamiento al azar ("random priming").

4.2 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN HEPÁTICA Y FUNCIONALIDAD DE LA PROTEÍNA UCP2

Con objeto de comprobar si la expresión del mRNA del gen UCP2 en el hígado de los ratones transgénicos se acompañaba de la expresión de esta proteína en las mitocondrias de este órgano, se llevó a cabo un análisis por *Western blot* de la presencia de UCP2 en mitocondrias aisladas de hígado de ratones transgénicos y controles. La **Figura 3 (A y B)** muestra la presencia de proteína UCP2 en extractos de mitocondrias aisladas de ratones transgénicos ayunados 24 o 48 horas.

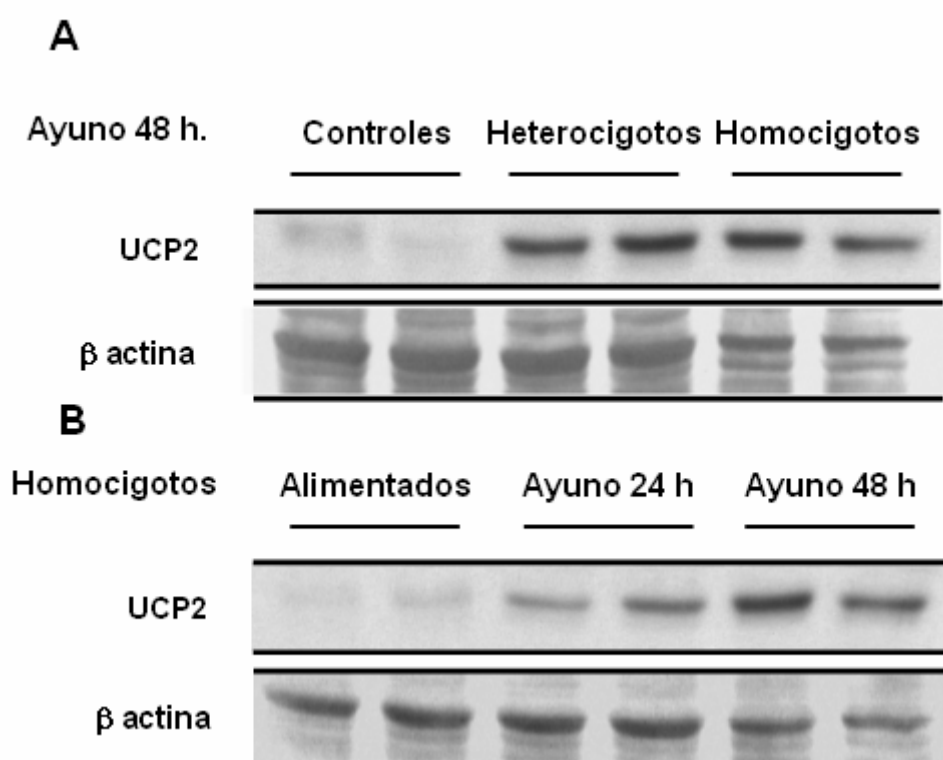


Figura 3.- Niveles de UCP2 en mitocondrias obtenidas de hígado de ratones controles y transgénicos. Los extractos de proteínas mitocondriales (36 μ g/pocillo) fueron separados mediante electroforesis en geles de poliacrilamida 12.5% en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) y analizados por Inmunoblot con anticuerpos anti-UCP2 y anti- β actina (ver *Materiales y métodos*). **A)** Niveles de proteína UCP2 en mitocondrias de ratones controles, heterocigotos y homocigotos

ayunados 48 horas. **B)** Niveles de proteína UCP2 en mitocondrias de ratones homocigotos (2 animales) alimentados y ayunados 24 y 48 horas.

Como cabía esperar, en extractos de mitocondrias aisladas de ratones controles ayunados 48 horas no se apreció banda alguna correspondiente a la proteína UCP2. Hay que mencionar que no parecieron existir diferencias significativas en la cantidad de UCP2 presente en los extractos mitocondriales de ratones heterocigotos y homocigotos (**Figura 3A**). De acuerdo con la regulación de la actividad del promotor de la PEPCK por la dieta y el ayuno, los niveles de UCP2 fueron prácticamente indetectables en los extractos mitocondriales de animales transgénicos normalmente alimentados, observándose un claro incremento con el ayuno de 24 y 48 h. (**Figura 3B**).

La función desacoplante de la proteína UCP2 se evaluó por sus efectos sobre el consumo de O_2 y el potencial de membrana mitocondrial, así como por su influencia sobre la concentración hepática de nucleótidos de adenina.

Para determinar si la sobreexpresión hepática de la proteína UCP2 provocaba el desacoplamiento de la fosforilación oxidativa mitocondrial, y por tanto un aumento del transporte electrónico y de la respiración mitocondrial, se midió el consumo de O_2 mediante un electrodo de Clark, en mitocondrias aisladas de hígado de ratones controles y transgénicos. La **Tabla 1** muestra como en las mitocondrias hepáticas aisladas de ratones transgénicos ayunados 24 horas, el consumo de O_2 en presencia de succinato 10 mM es un 38% mayor que el medido en mitocondrias aisladas de ratones controles (respectivamente, $11,5 \pm 0,2$ y $8,3 \pm 0,7$ nmoles O_2 / mg proteína x min; $p < 0,001$; $n = 5$ experimentos). La presencia adicional de ADP (180 μ M) provocó un aumento del consumo de O_2 , tanto en las mitocondrias aisladas de ratones controles (2,3 veces) –como cabía esperar– como en las obtenidas de ratones transgénicos (2,5 veces). En estas condiciones, de nuevo el consumo de O_2 fue mayor (47%) en las mitocondrias aisladas de ratones transgénicos que en las mitocondrias obtenidas de ratones controles (respectivamente, $28,8 \pm 3,4$ y $19,5 \pm 0,7$ nmoles O_2 / mg proteína x min; $p < 0,001$; $n = 5$ experimentos).

Cuando se midió el consumo de O_2 en presencia de succinato (10 mM) y del agente desacoplante FCCP (2 μ M) se produjo un aumento del consumo de O_2 de casi 3 veces en las mitocondrias de ratones controles y de 2,4 veces en las mitocondrias de ratones transgénicos, en relación con los correspondientes consumos de O_2 medidos en presencia sólo de succinato (10 mM).

Cabe destacar que en las mitocondrias de ratones transgénicos, el consumo de O_2 en presencia de ADP fue ya máximo, puesto que en estas condiciones se obtuvieron valores similares a los observados en presencia del agente desacoplante FCCP (respectivamente, $28,8 \pm 3,4$ y $28,2 \pm 2,7$ nmoles O_2 / mg proteína x min; $p < 0,001$; $n = 5$ experimentos). Estos resultados sugieren que la sobreexpresión de UCP2 en las mitocondrias hepáticas de ratones transgénicos provoca un desacoplamiento de la fosforilación oxidativa prácticamente máximo (**Tabla 1**):

Tabla 1. Consumo de O_2 en mitocondrias aisladas de ratones controles y heterocigotos.

Consumo de O_2 (nmoles O_2 x mg proteína ⁻¹ x min ⁻¹)			
	Succinato (10mM)	Succinato (10mM) + ADP (180 μ M)	Succinato (10mM) + FCCP (2 μ M)
Controles	8.3 ± 0.7	$19.5 \pm 0.7^{***}$	$24.6 \pm 1.7^{***}$
Transgénicos	$11.5 \pm 0.2^{##}$	$28.8 \pm 3.4^{***, \dagger}$	$28.2 \pm 2.7^{***, ns}$

Mitocondrias aisladas de ratones ayunados 24 h fueron incubadas con los compuestos indicados, a 37°C, durante 8 minutos. El consumo de O_2 se midió usando un electrodo de Clark. Los valores son la media \pm E.E.M. de cinco experimentos independientes de diferentes animales. La significación estadística de las diferencias se expresa como: *** $p < 0.001$, en relación a su correspondiente valor de succinato y como \dagger $p < 0.05$; ## $p < 0.001$, ^{ns}: no significativo, en relación a sus correspondientes valores obtenidos en mitocondrias de animales controles.

Otra de las pruebas llevadas a cabo para determinar la funcionalidad de la proteína UCP2 fue estudiar, si como cabía esperar, la expresión mitocondrial de UCP2 producía una disminución en el potencial de membrana mitocondrial, generado en mitocondrias acopladas durante el proceso de fosforilación oxidativa (Negre-Salvayre et al. 1997; Couplan et al. 2002; Skarka et al. 2003; Affourtit and Brand 2008). Así, el potencial de membrana se midió en mitocondrias aisladas de hígado de ratones

transgénicos heterocigotos y controles, registrando la fluorescencia emitida por la rodamina-123. Este agente es un fluoróforo catiónico lipofílico que se acumula en la matriz mitocondrial en función del potencial de membrana generado en las mitocondrias funcionantes (Scaduto and Grotyohann 1999).

En este sentido, el potencial de membrana de las mitocondrias aisladas de ratones transgénicos ayunados 24 horas e incubadas como se indica en **Materiales y Métodos** (Apartado 3.11) en presencia de succinato (10 mM) y rodamina-123 (1 μ M) fue un 35% menor que el observado en mitocondrias aisladas de ratones controles (respectivamente, $101 \pm 10,8$ y $154 \pm 3,6$ Unidades arbitrarias de fluorescencia/ mg de proteína; $p < 0,001$; $n = 5$ experimentos) (**Figura 4**). La adición de ADP (180 μ M), al permitir la síntesis de ATP y por tanto la puesta en marcha de la fosforilación oxidativa, incrementó en un 28% el potencial de membrana generado por el succinato en ratones controles (respectivamente, $197 \pm 12,6$ y $154 \pm 3,6$ Unidades arbitrarias de fluorescencia/ mg de proteína; $p < 0,01$; $n = 5$ experimentos). Sin embargo, en mitocondrias de ratones transgénicos incubadas en estas mismas condiciones, el potencial de membrana no aumentó con la adición de ADP (respectivamente, $107 \pm 7,3$ y $101 \pm 10,8$ Unidades arbitrarias de fluorescencia/ mg de proteína; $p > 0,05$; $n = 5$ experimentos), probablemente debido al efecto desacoplante que la sobreexpresión de UCP2 provoca. Por otro lado, en estas últimas condiciones, la presencia adicional de GDP (0,5 mM) -nucleótido que actúa como un inhibidor alostérico de la actividad desacoplante de la UCP2- revirtió la disminución del potencial de membrana medido en mitocondrias de ratones transgénicos, retornando a los valores obtenidos en mitocondrias de ratones controles (respectivamente, 172 ± 13 y 182 ± 26 Unidades arbitrarias de fluorescencia/ mg de proteína; $p > 0,05$; $n = 5$ experimentos), (**Figura 4**).

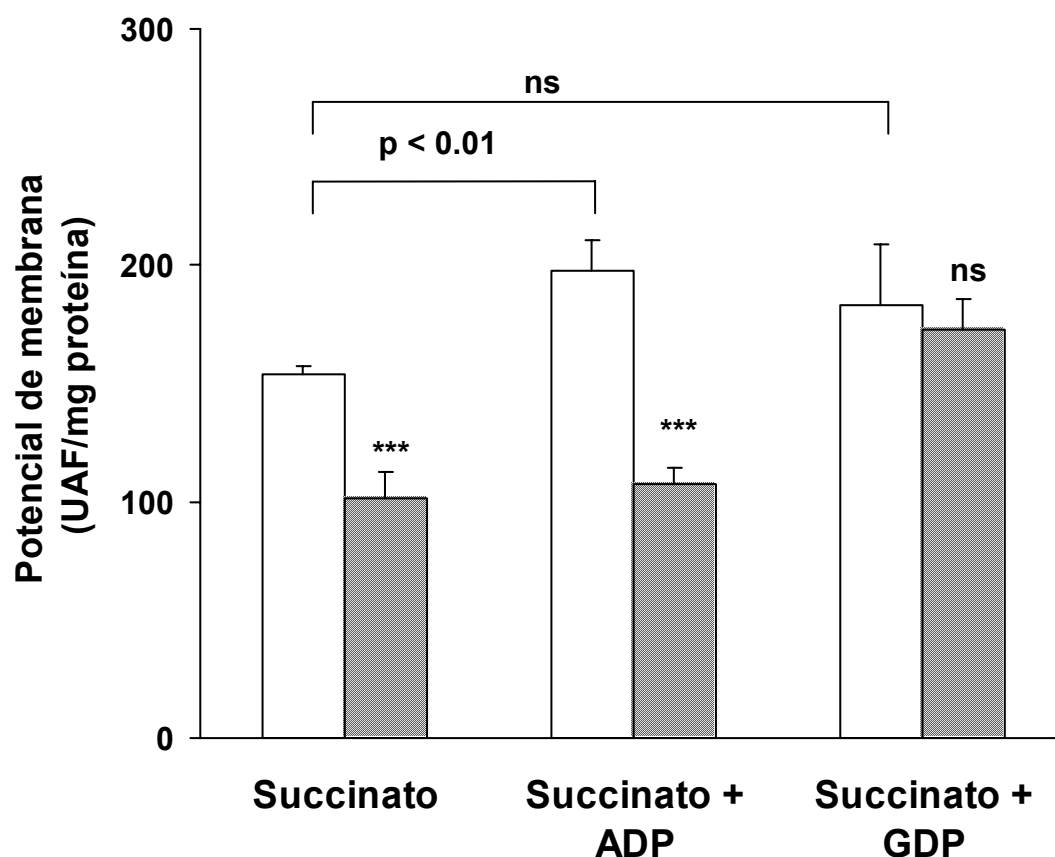


Figura 4. Potencial de membrana en mitocondrias aisladas de ratones controles y transgénicos. Mitocondrias aisladas de ratones ayunados 24 h fueron incubadas con los compuestos indicados (10 mM succinato, 180 μ M ADP, 0.5 mM GDP) y con la sonda fluorescente rodamina 123, a 37°C, durante 8 minutos. Para medir la entrada inespecífica de rodamina se utilizó como control el agente desacoplador FCCP. La fluorescencia obtenida con FCCP se restó a las medidas obtenidas. La significación estadística de las diferencias se expresa como: *** $p < 0.001$, ns: no significativo, en relación a sus correspondientes controles. □ Controles ■ Transgénicos

Todos estos resultados indican que la sobreexpresión de UCP2 en las mitocondrias hepáticas provoca un efecto desacoplante entre el transporte electrónico y la fosforilación oxidativa, que se manifiesta en un incremento en el consumo de O₂ y en un menor potencial de membrana en las mitocondrias aisladas funcionantes. Este efecto desacoplante de la UCP2 no parece ser debido a la alteración de la estructura de la membrana interna mitocondrial por la sobreexpresión de UCP2, sino a la propia función desacoplante de esta proteína. En apoyo de esta hipótesis, hay que mencionar que la presencia de GDP, inhibidor alostérico de esta acción desacoplante de la UCP2, es capaz de revertir la disminución producida en el potencial de membrana mitocondrial observado en las mitocondrias que sobreexpresan UCP2.

Si el efecto desacoplante de la UCP2 observado en estudios *in vitro* en mitocondrias aisladas ocurre también *in vivo* en el hígado de los ratones transgénicos, este efecto desacoplante debe manifestarse en una alteración en la concentración hepática de los nucleótidos de adenina. Efectivamente, cuando se midió la concentración hepática de ATP se encontró una disminución significativa en los ratones transgénicos que sobreexpresan UCP2, en comparación con los valores obtenidos en hígados de ratones controles, tanto en animales ayunados 24 como 48 horas (1.03 ± 0.17 vs 1.75 ± 0.15 μ moles/g de tejido, para animales transgénicos y controles, respectivamente, ayunados 48 horas; $p < 0.05$; $n = 6$ experimentos) (**Tabla 2**). Simultáneamente los niveles hepáticos de AMP estaban aumentados en los hígados de ratones transgénicos frente a los detectados en ratones controles (0.51 ± 0.04 vs 0.26 ± 0.03 μ moles/g de tejido, para animales transgénicos y controles, respectivamente, ayunados 48 horas; $p < 0.01$; $n = 6$ experimentos). Además, la carga energética (\bar{e}) en el hígado disminuyó significativamente en los ratones transgénicos ayunados 24 y 48 horas, en relación con la estimada en el hígado de animales controles (**Tabla 2**).

Estos resultados apoyan la existencia de un efecto desacoplante de la proteína UCP2 *in vivo*, lo que provoca una disminución en la producción mitocondrial de ATP, y en consecuencia una caída de su concentración hepática. Ello se acompaña de un aumento de los niveles hepáticos de AMP y una caída en el valor de la carga energética medida en el hígado de los animales transgénicos.

Tabla 2. Niveles de ATP, ADP, AMP y carga energética (\bar{e}) en ratones controles, y transgénicos ayunados 24 y 48 horas.

Nucleótidos de adenina ($\mu\text{mol/gr}$ tejido)			
	Ayuno (h)	Controles	Transgénicos
ATP	24h	1.63 ± 0.10	$1.26 \pm 0.12^*$
	48h	1.75 ± 0.15	$1.03 \pm 0.17^*$
ADP	24h	0.78 ± 0.07	$0.83 \pm 0.06^{\text{ns}}$
	48h	0.78 ± 0.03	$0.82 \pm 0.07^{\text{ns}}$
AMP	24h	0.26 ± 0.02	$0.41 \pm 0.04^{**}$
	48h	0.26 ± 0.03	$0.51 \pm 0.04^{**}$
(\bar{e})	24h	0.76 ± 0.02	$0.66 \pm 0.03^*$
	48h	0.76 ± 0.02	$0.6 \pm 0.04^{**}$

Después de 24 ó 48 horas de ayuno, muestras de hígado de ratones anestesiados fueron rápidamente congeladas en N_2 y procesadas. La carga energética (\bar{e}) se calculó con la fórmula: $[\text{ATP}] + \frac{1}{2} [\text{ADP}] / [\text{ATP}] + [\text{ADP}] + [\text{AMP}]$. Los valores corresponden a las medias \pm E.E.M. de 6-8 animales. La significación estadística de las diferencias se expresa como: $*p < 0.05$; $**p < 0.01$; $^{\text{ns}}$: no significativo, en relación a su correspondiente valor control.

4.3 ALTERACIONES METABÓLICAS ASOCIADAS A LA SOBREEXPRESIÓN HEPÁTICA DE UCP2

En una primera aproximación se estudió la evolución del peso corporal y la respuesta a una sobrecarga de glucosa e insulina en ratones controles y transgénicos que sobreexpresaban UCP2 en hígado.

Así, tal como muestra la **Figura 5A**, a lo largo de tres meses de vida y en animales alimentados con una dieta estándar (A04 Panlab), los valores de peso corporal de los animales transgénicos heterocigotos se situaron siempre por debajo de los valores del peso corporal de los animales controles, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas (ANOVA más Tukey-Kramer). Del mismo modo, el incremento en el peso corporal en estas mismas condiciones y durante el mismo periodo de tiempo, tampoco mostró diferencias significativas entre ratones transgénicos heterocigotos y los ratones controles (**Figura 5B**).

Cuando se llevó a cabo una prueba de tolerancia a la glucosa en ratones transgénicos y en ratones controles, todos ellos ayunados 24 o 48 horas (**Figuras 6A y 6B**, respectivamente), no se observaron diferencias estadísticamente significativas en los niveles máximos de glucemia alcanzados, ni en el perfil de las curvas obtenidas a lo largo de las dos horas que duraba la prueba (ANOVA más Tukey-Kramer y “superficie bajo la curva”). No obstante, hay que mencionar que en el caso de los animales ayunados 48 horas, en los que la expresión del transgén UCP2 está significativamente incrementada (ver **Figura 3**), los valores de glucemia en los ratones transgénicos fueron inferiores a los valores medidos en los ratones controles, a todos los tiempos ensayados.

Del mismo modo, tampoco se observaron diferencias estadísticamente significativas en la respuesta hipoglucémica, entre ratones transgénicos heterocigotos y ratones controles alimentados con una dieta estándar sometidos a una prueba de tolerancia a la insulina (**Figura 7**). La ausencia de diferencia entre animales control y transgénicos en relación con la sensibilidad a la insulina podría ser debida a que la expresión del transgén UCP2 es prácticamente inexistente en animales transgénicos alimentados (ver **Figura 3**).

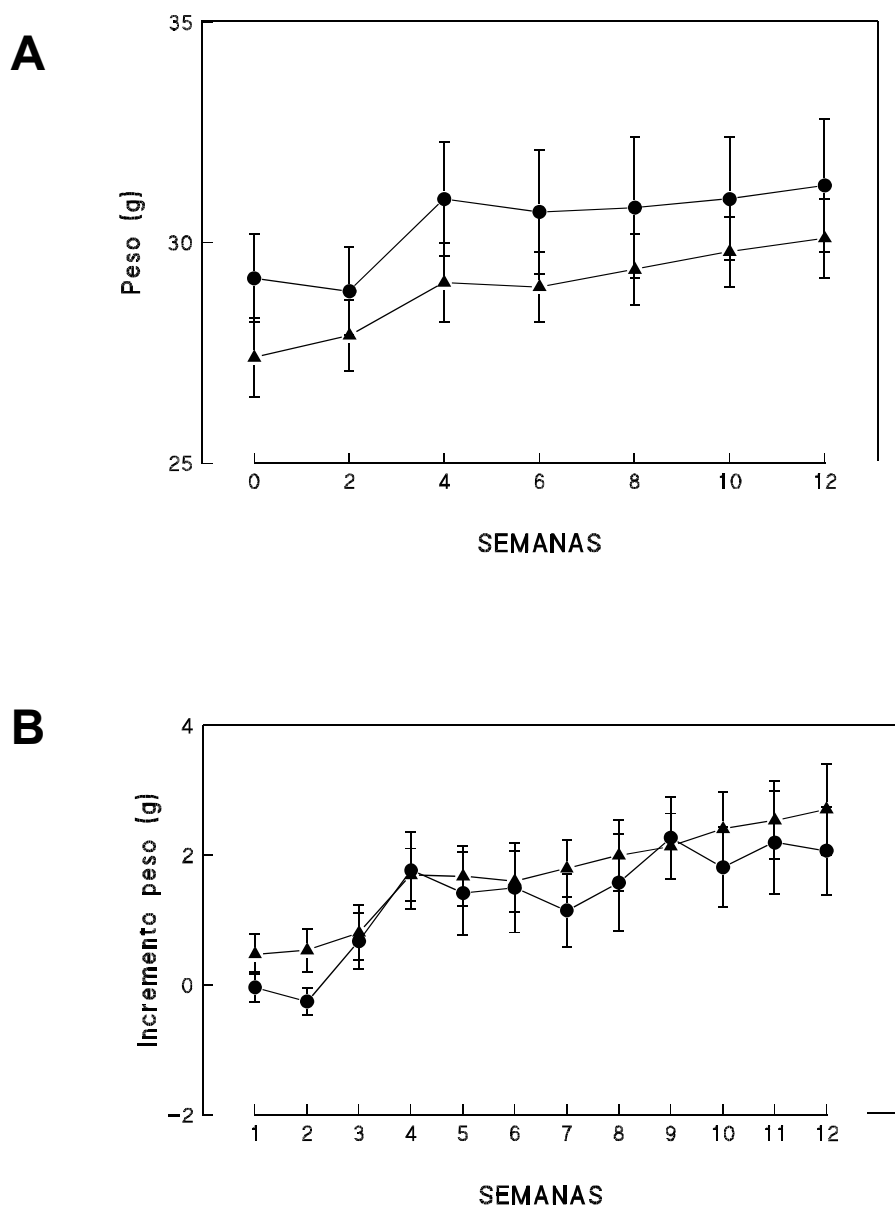
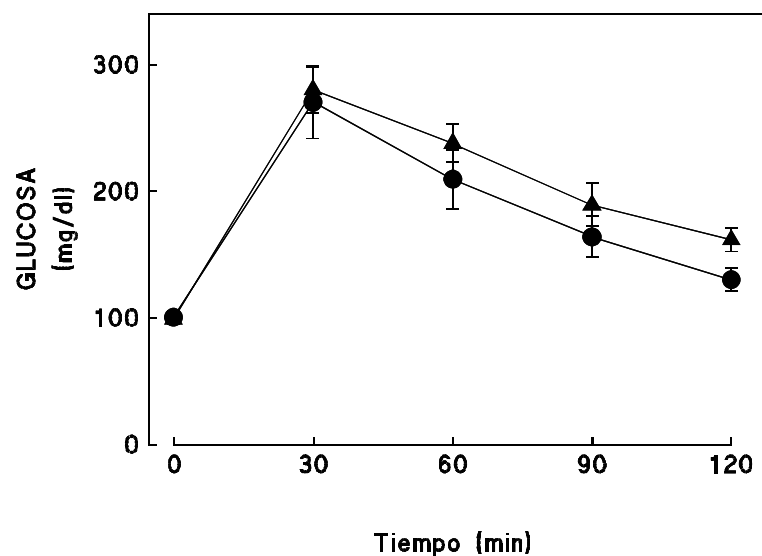


Figura 5. A) Evolución del peso de ratones controles y transgénicos. B) Incrementos de peso de ratones controles y transgénicos durante 3 meses. Ratones controles y transgénicos de tres meses de edad fueron alimentados con dieta estándar (A04 Panlab) durante otros tres meses y fueron pesados semanalmente. Los incrementos de peso se calcularon tomando como peso inicial el obtenido en la semana cero. Los valores son la media \pm .E.E.M. de 14 animales (●) Controles; (▲) Transgénicos

A



B

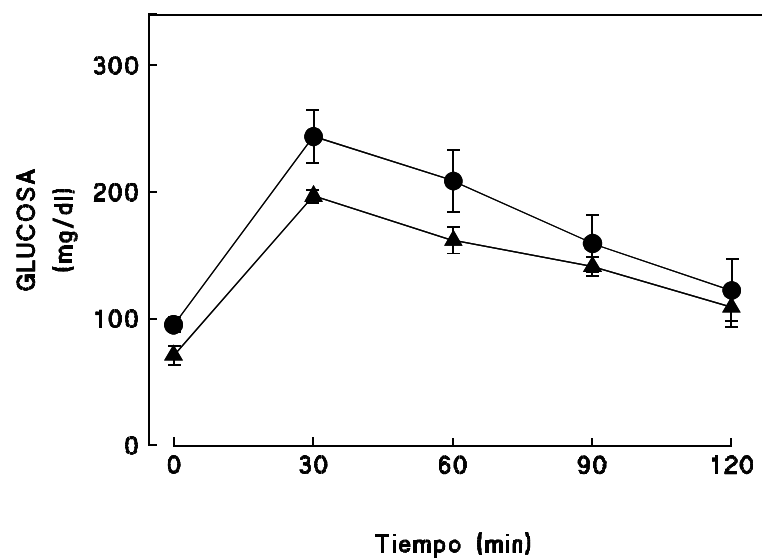


Figura 6. Curva de tolerancia a la glucosa en ratones controles y transgénicos.

Tras un ayuno de 24 (A) ó 48 horas (B) se extrajo sangre de la cola de ratones de seis meses de edad para determinar la glucemia basal. Seguidamente se inyectó glucosa intraperitonealmente (1 mg/g peso ratón) y se determinó la concentración de glucosa plasmática a los tiempos indicados. Los valores son la media \pm E.E.M. de 14 animales. (●) Controles; (▲) Transgénicos

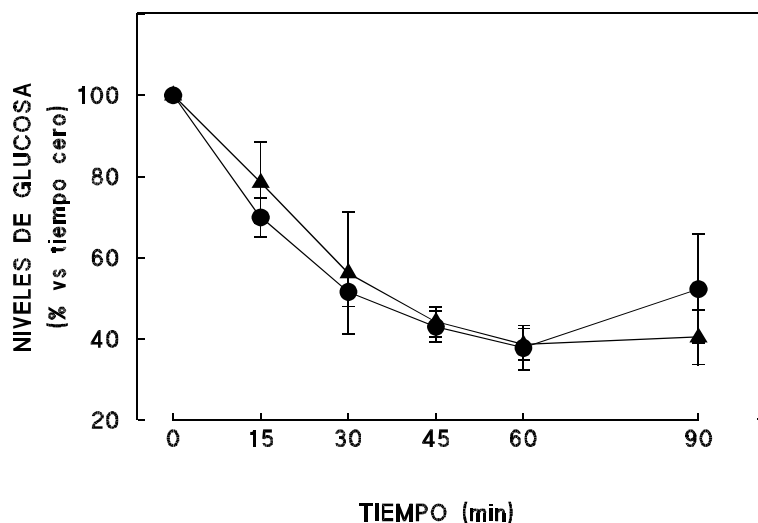


Figura 7. Curva de tolerancia a la insulina en ratones controles y transgénicos.

En ratones de seis meses de edad normalmente alimentados se extrajo sangre de la cola para determinar la glucemia basal. Seguidamente se inyectó insulina intraperitonealmente (0.75 U/kg peso ratón) y se determinó la concentración de glucosa plasmática a los tiempos indicados. Los valores son la media \pm E.E.M. de 13 animales y se representan en porcentaje respecto a la glucemia basal. (●) Controles; (▲) Transgénicos.

4.4 RESPUESTA DE LOS ANIMALES TRANSGÉNICOS A UNA DIETA ALTA EN LÍPIDOS

A continuación, estudiamos una serie de cambios en el fenotipo metabólico de los animales transgénicos heterocigotos que sobreexpresan UCP2 en hígado y de animales controles, en respuesta a la alimentación con una dieta alta en lípidos (HFD) (42 %), durante tres meses. Este estudio estuvo motivado por el hecho de que se ha demostrado la participación de alteraciones en la expresión de UCP2 y/o la existencia de polimorfismos génicos relacionados con el desarrollo de obesidad (Cortez-Pinto et al. 1999; Chan et al. 2001; Zhang et al. 2001). Asimismo, se ha observado en diferentes modelos animales que la sobreexpresión de UCP2 y/o UCP3 en músculo esquelético produce resistencia a la aparición de obesidad provocada por una dieta alta en lípidos (Son et al. 2004; Tiraby et al. 2007).

Durante los tres meses en los que se sometieron animales controles y transgénicos a una dieta alta en lípidos, se llevó a cabo un estudio de la evolución del peso corporal. También, se estudió la tolerancia a la glucosa, la sensibilidad a la insulina y se determinaron las concentraciones de diferentes parámetros séricos. Posteriormente, tras el sacrificio de los animales se procedió al análisis de la expresión hepática del mRNA de UCP2.

4.4.1 Evolución del peso corporal en ratones controles y transgénicos alimentados con dieta alta en lípidos

Durante tres meses, se estudió la evolución del peso corporal de ratones transgénicos heterocigotos y controles sometidos todo este tiempo a una dieta alta en lípidos (TD 88137, Harlan Teklad), o a una dieta estándar (A04, Panlab). Tal como muestra la **Figura 8**, no se observaron diferencias significativas en el incremento de peso observado en animales transgénicos y controles sometidos a una dieta estándar, tal como se había descrito anteriormente (**Figura 5**). Sin embargo, cuando los animales fueron alimentados con una dieta alta en lípidos, el incremento de peso a lo largo de los tres meses que duró la prueba fue significativamente menor en los animales transgénicos que en los controles, con dos perfiles claramente diferentes en el incremento de peso. Así, tras tres meses con dieta alta en lípidos, el peso alcanzado por los ratones controles fue de $9,07 \pm 0,76$ g, mientras que el peso de los ratones transgénicos fue de $6,33 \pm 0,9$ g.

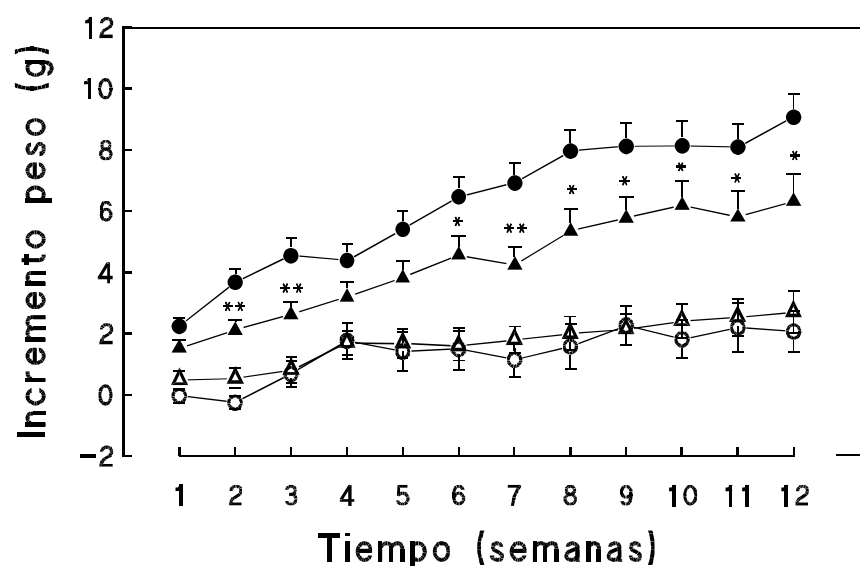


Figura 8. Incrementos de peso de ratones controles y transgénicos alimentados con dieta control o con dieta alta en lípidos (HFD). Ratones controles y transgénicos de 3 meses de edad fueron alimentados con dieta control o con dieta alta en lípidos (HFD) durante otros tres meses, y pesados semanalmente. Los incrementos de pesos se calcularon tomando como peso inicial el obtenido en la semana cero. Los valores corresponden a las medias \pm E.E.M. de 14 animales. La significación estadística de las diferencias se expresa como: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, en relación a su correspondiente valor control. (●) Controles HFD; (▲) Transgénicos HFD; (○) Controles dieta control; (△) Transgénicos dieta control.

4.4.2 Curvas de tolerancia a la glucosa e insulina en ratones controles y transgénicos alimentados con dieta alta en lípidos

Tal como muestra la **Figura 9**, la curva de tolerancia a glucosa -realizada tras 24 horas de ayuno y administración intraperitoneal de glucosa (1 mg/g peso corporal) - no mostró diferencias significativas a ninguno de los tiempos estudiados entre los ratones transgénicos y los ratones controles, alimentados todos ellos durante tres meses con la dieta estándar (A04, Panlab), lo que confirma lo anteriormente descrito (**Figura 6A**). Sin embargo, en los animales alimentados con una dieta alta en lípidos (TD 88137, Harlan Teklad), se observó como los ratones transgénicos presentaban una glucemia basal (tiempo 0 min) ligeramente inferior a la de los ratones controles, aunque la

diferencia no era estadísticamente significativa ($133,6 \pm 7,7$ vs. $153,3 \pm 11$ mg/dl, para animales transgénicos y controles, respectivamente; $n=14$ animales en cada grupo). Asimismo, los valores de glucemia alcanzados tras la sobrecarga de glucosa fueron inferiores en los animales transgénicos, en relación con los valores de glucemia alcanzados en los ratones controles, a lo largo de toda la prueba, aunque las diferencias sólo fueron estadísticamente significativas en el tiempo 30 min ($275,8 \pm 14,9$ vs. $320,5 \pm 14,6$ mg/dl, para animales transgénicos y controles, respectivamente; $p<0,05$).

Estos resultados parecen indicar que los animales transgénicos presentan una cierta resistencia a desarrollar intolerancia a la glucosa en respuesta a una dieta alta en lípidos, en comparación con los animales controles.

A continuación, se procedió a realizar una prueba de sensibilidad a la insulina en los animales controles y transgénicos alimentados con dieta estándar o con dieta alta en lípidos (**Figura 10**). Tal como habíamos observado (**Figura 7**), el perfil de glucemia manifestado por los animales controles y transgénicos alimentados con una dieta estándar no presentó diferencias significativas a lo largo de toda la prueba, tras la administración intraperitoneal de insulina (0.75 U/kg peso corporal).

Por el contrario, los animales controles alimentados con una dieta alta en lípidos presentaron, como era de esperar, una clara resistencia a la acción de la insulina, en relación con los ratones controles alimentados con una dieta estándar, con una significativamente menor respuesta hipoglucémica (a 15 min: $97,7 \pm 7,4$ vs. $69,9 \pm 6,3$ % de la glucemia a tiempo cero, $p>0.05$; a 60 min: $75,2 \pm 6,2$ vs. $37,8 \pm 5,4$ % de la glucemia a tiempo cero, $p<0.01$, respectivamente, para animales controles alimentados con dieta alta en lípidos vs. animales controles alimentados con dieta estándar; $n=14$ animales en cada grupo).

Por otro lado, los animales transgénicos alimentados con dieta alta en lípidos fueron más sensibles a la acción de la insulina que los correspondientes animales controles, presentando valores de glucemia inferiores durante los primeros 45 minutos de duración de la prueba. Las diferencias en la glucemia entre animales controles y transgénicos alimentados con HFD fueron estadísticamente significativas para el tiempo 15 minutos tras la administración de insulina ($77,2 \pm 3,9$ vs. $97,7 \pm 7,4$ % vs tiempo cero; $p<0,05$; $n=14$ animales en cada grupo). Así pues, la resistencia a la insulina provocada por una dieta alta en lípidos es significativamente menor en los animales transgénicos que sobreexpresan UCP2.

Estos resultados muestran que la acción diabetogénica de la dieta alta en lípidos es menos efectiva en los animales transgénicos para UCP2 que en los animales controles. Así, la sobreexpresión hepática de UCP2 provoca una menor intolerancia a la glucosa y una menor resistencia a la acción de la insulina en respuesta a una dieta alta en lípidos.

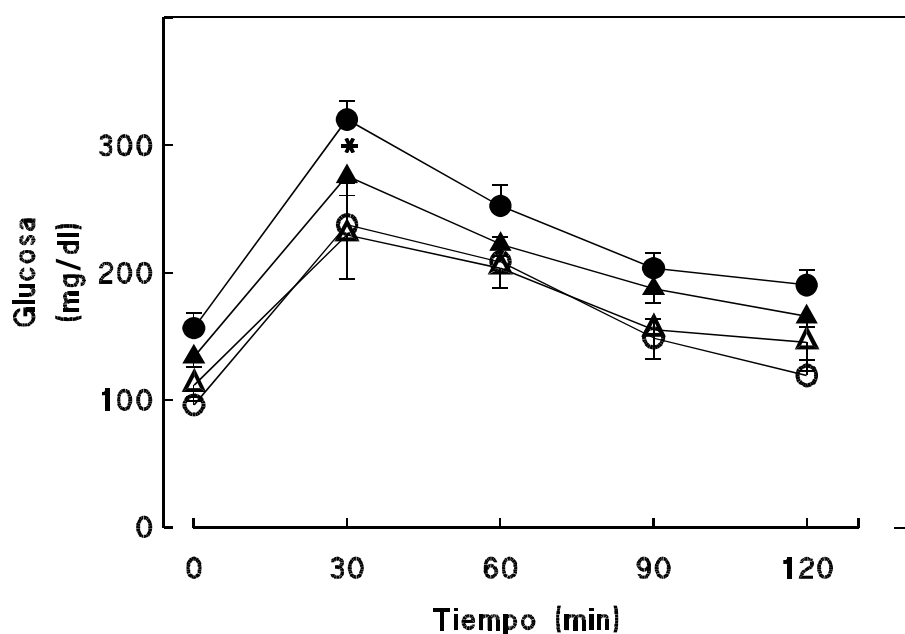


Figura 9. Curva de tolerancia a la glucosa en ratones controles y transgénicos sometidos a dieta control y a dieta alta en lípidos (HFD) durante tres meses. Tras un ayuno de 24 h se extrajo sangre de la cola de ratones de seis meses de edad para determinar la concentración de glucosa basal. Seguidamente se inyectó glucosa intraperitonealmente (1 mg/g peso ratón) y se determinó la concentración de glucosa plasmática a los tiempos indicados. Los valores corresponden a las medias \pm E.E.M. de 14 animales. La significación estadística de las diferencias se expresa como: * $p < 0.05$ entre animales controles HFD y transgénicos HFD. (●) Controles HFD; (▲) Transgénicos HFD; (○) Controles dieta control; (△) Transgénicos dieta control.

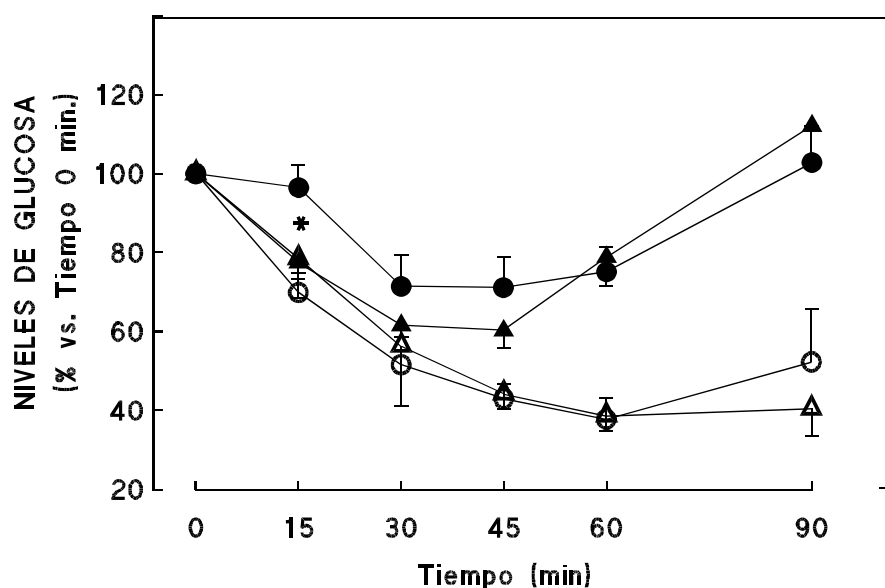


Figura 10. Curva de tolerancia a la insulina en ratones controles y transgénicos sometidos a dieta control y a dieta alta en lípidos (HFD) durante tres meses. En ratones de 6 meses de edad, alimentados durante los últimos 3 meses con dieta estándar o alta en lípidos (HFD), y sin ayuno previo, se extrajo sangre de la cola para determinar la concentración de glucosa basal. Seguidamente se inyectó insulina intraperitonealmente (0,75 U/Kg peso ratón) y se determinó la concentración de glucosa plasmática a los tiempos indicados. Los valores corresponden a las medias \pm E.E.M. de 14 animales. La significación estadística de las diferencias se expresa como: * $p < 0.05$ entre animales controles HFD (●) y transgénicos HFD (▲). (○) Controles dieta control; (△) Transgénicos dieta control.

4.4.3 Niveles séricos de diferentes metabolitos en ratones controles y transgénicos alimentados con dieta rica en lípidos

Al cabo de 3 meses de alimentar a los ratones controles y transgénicos con dieta estándar o dieta alta en lípidos (HFD), se procedió al ensayo en suero de una serie de parámetros metabólicos, tanto en animales alimentados como ayunados 24 h. En los animales alimentados, el valor de la glucemia basal no fue significativamente diferente entre los animales controles y transgénicos sometidos a una dieta estándar o a una dieta alta en lípidos (**Tabla 3**). No obstante, la dieta alta en lípidos provocó un incremento de 5 veces en los niveles séricos de insulina en los animales controles ($10,4 \pm 1,84$ vs. $1,88 \pm 0,4$ ng/ml, respectivamente; $p < 0,01$; $n=8$ animales en cada grupo), lo que claramente indica el desarrollo de resistencia a la insulina en estos animales por la dieta alta en lípidos. En el caso de los animales transgénicos, la dieta alta en lípidos también aumentó los niveles séricos de insulina en relación con los alimentados con dieta estándar, pero en este caso tan solo por un factor de 3 ($4,16 \pm 0,87$ vs. $1,43 \pm 0,18$ ng/ml, respectivamente; $p < 0,05$; $n= 8$ animales en cada grupo), lo cual parece indicar que los animales transgénicos son menos propensos a desarrollar resistencia a la insulina en respuesta a la dieta alta en lípidos.

En los animales ayunados 24 horas, si bien no se observaron diferencias significativas en las glucemias basales de los animales controles y transgénicos sometidos a dieta estándar, la administración de una dieta alta en lípidos incrementó significativamente los valores de la glucemia basal en ambos tipos de animales. Hay que destacar que en los animales sometidos a una dieta alta en lípidos el valor de la glucemia basal fue significativamente menor en los animales transgénicos que en los controles ($131,2 \pm 4,3$ vs. $152,3 \pm 8,7$ mg/dl, respectivamente; $p < 0.05$ $n= 8$ animales en cada grupo), lo cual está de acuerdo con el hecho de que los animales transgénicos para UCP2 son más resistentes al desarrollo de diabetes que los animales controles.

En relación con los niveles de colesterol y triglicéridos en suero, si bien la dieta alta en lípidos incrementó los valores de estos metabolitos en comparación con los medidos en los animales sometidos a dieta estándar, no se observó diferencias significativas entre los valores medidos en animales controles y transgénicos. Con respecto a los niveles séricos de FFA, estos no se modificaron significativamente por el efecto de la dieta, ni fueron diferentes entre animales controles y transgénicos.

Finalmente, tras el sacrificio de los animales a los 3 meses de estar sometidos a una dieta alta en lípidos, se extrajo y se pesó el tejido adiposo epididimal, observándose un incremento por el efecto de la dieta alta en lípidos tanto en animales controles como en los transgénicos ($2,11 \pm 0,11$ vs. $1,99 \pm 0,14$ gramo, respectivamente; $p > 0.05$ $n = 8$ animales en cada grupo), aunque sin existir diferencias estadísticamente significativas entre ambos tipos de animales.

Los resultados obtenidos con la medición de una serie de parámetros metabólicos en suero refuerzan lo anteriormente observado en los estudios de tolerancia a la glucosa e insulina. Así, los animales transgénicos para UCP2 presentan resistencia a la acción diabetogénica de una dieta alta en lípidos, en comparación con los animales controles. Ello se manifiesta en niveles inferiores de insulina circulante y en valores de glucemia basal menores, en los animales transgénicos, alimentados con una dieta alta en lípidos, en relación con los animales controles.

4.4.4 Análisis de la sobreexpresión del gen UCP2 en ratones controles y transgénicos alimentados con dieta alta en lípidos

Tras el sacrificio de los animales, se procedió al análisis de los niveles de mRNA de UCP2 en el hígado de los animales controles y transgénicos alimentados con dieta estándar o dieta alta en lípidos por la técnica de Northern blot, tras ayuno previo de 24 horas. Tal como se puede ver en la **Figura 11**, la expresión del transgén en los animales transgénicos no se vió aparentemente modificada por la dieta alta en lípidos durante 3 meses. Del mismo modo, los animales controles -independientemente de la dieta con que fueron alimentados- no mostraron expresión del mRNA de UCP2.

Tabla 3. Niveles séricos de diferentes metabolitos y peso del tejido adiposo epididimal en ratones controles y transgénicos alimentados con dieta control o alta en lípidos (HFD) durante tres meses.

	Dieta control		Dieta alta en lípidos	
	Controles	Transgénicos	Controles	Transgénicos
<u>Animales alimentados</u>				
Glucosa (mg/dl)	133.1 ± 9.2	146.3 ± 5.9	147.3 ± 6.3	140.5 ± 6.3
Insulina (ng/ml)	1.88 ± 0.4	1.43 ± 0.18	10.4 ± 1.84 **	4.16 ± 0.87 ‡ *
<u>Animales ayunados 24h</u>				
Glucosa (mg/dl)	83.5 ± 6	88.1 ± 7.2	152.3 ± 8.7 ***	131.2 ± 4.3 ‡ ***
FFA (mmol/l)	0.52 ± 0.04	0.69 ± 0.1	0.56 ± 0.08	0.57 ± 0.06
Colesterol (mg/dl)	130.2 ± 3.8	136.7 ± 3.2	188.6 ± 17.4 **	179.8 ± 8.6 ***
Triglicéridos (mg/dl)	113.8 ± 8.1	108.6 ± 8.7	125.2 ± 4.5 *	128.5 ± 9.3 **
Peso del tejido adiposo epididimal (g)	0.52 ± 0.11	0.74 ± 0.08	2.11 ± 0.11 ***	1.99 ± 0.14 ***

La glucosa plasmática y los parámetros séricos se midieron en ratones controles y transgénicos heterocigotos alimentados con dieta normal o dieta alta en lípidos (HFD) como se describe en *Materiales y métodos*. Los valores corresponden a las medias \pm E.E.M de 8 animales en cada grupo. La significación estadística de las diferencias se expresa como * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ entre animales transgénicos HFD y transgénicos dieta control; controles HFD vs. controles dieta control. [‡] $P < 0.05$ transgénicos HFD vs. controles HFD.

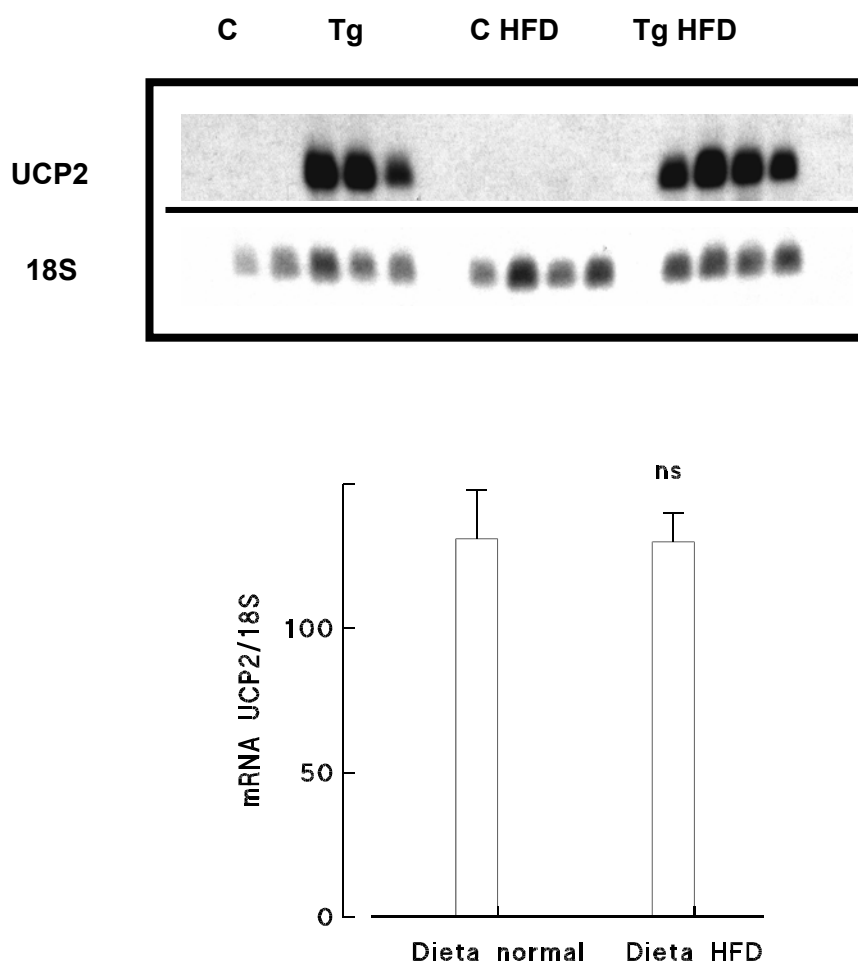


Figura 11. Determinación de los niveles de mRNA de UCP2 en hígado de ratones controles y transgénicos alimentados con dieta estándar o con dieta alta en lípidos (HFD), y ayuno previo de 24 horas. RNA total (20µg/ pocillo) se sometió a electroforesis en geles de agarosa (1.2%) y se transfirió a membranas de nylon. Las hibridaciones se llevaron a cabo usando el cDNA completo de UCP2, marcado radiactivamente con [α -P32] dCTP por cebamiento al azar ("random priming"). La relación UCP2/18S se expresa en unidades arbitrarias. ns: no significativo, Tg HFD vs. Tg.

4.5 SOBREEXPRESIÓN DEL GEN hUCP2 EN HEPATOCITOS DE RATA EN CULTIVO PRIMARIO

En la última parte del trabajo nos planteamos desarrollar un modelo celular de hepatocitos cultivados capaces de expresar el gen hUCP2, con objeto de estudiar *in vitro* los efectos que la expresión de este transgén tiene sobre el metabolismo hepático de la glucosa. Para ello, se realizaron infecciones de hepatocitos de rata en cultivo primario con adenovirus portadores del gen hUCP2 (AdUCP2) o con adenovirus portadores del gen β gal (Ad β gal) como control, tal como se indica en Materiales y Métodos.

Así, hepatocitos de rata mantenidos durante 4 horas en cultivo primario, se infectaron con preparaciones de AdUCP2, Ad β gal (50 MOI). Trascorridas 2 horas se descartó el medio de cultivo, se lavaron 2 veces con el mismo medio de cultivo y se cultivaron durante 15 horas más en las condiciones que se describen en Materiales y Métodos. A partir de ese momento se llevaron a cabo los análisis que a continuación se describen.

4.5.1 Análisis de la expresión del mRNA y de la proteína del gen hUCP2 en hepatocitos de rata en cultivo primario

Lo primero que se analizó fue la expresión del mRNA del transgén hUCP2 en los hepatocitos infectados o no con los adenovirus antes mencionados. Así, los resultados que se presentan en la Figura 12 muestran claramente la expresión del mRNA del gen hUCP2 en los hepatocitos infectados con AdUCP2, no detectándose la expresión de este mensajero en hepatocitos no infectados o infectados con Ad β gal.

La transcripción y expresión del cDNA de la B galactosidasa se demostró incubando las células con X Gal, sustrato sintético de la B galactosidasa que al ser metabolizado resulta en la formación de un precipitado de color azul que tiñe toda la célula, pero de manera muy intensa los núcleos de aquellas que expresan el enzima. Al contar varios campos de células en las placas infectadas con Ad β gal vimos que el porcentaje de infección (células teñidas por campo) era aproximadamente del 95% (datos no mostrados).

Estos resultados tuvieron una clara correspondencia con la expresión de la proteína hUCP2 en hepatocitos infectados con el AdUCP2. Así, en la **Figura 13** se observa como la proteína UCP2 analizada por las técnicas de Western fue claramente

identificable en los homogenados de los hepatocitos infectados con AdUCP2, mientras que no se observó su presencia en homogenados de hepatocitos infectados con Ad β gal. Del mismo modo, la proteína UCP2 fue también identificada en extractos de mitocondrias aisladas de hepatocitos infectados con AdUCP2 y no en extractos de mitocondrias obtenidas de los hepatocitos infectados con Ad β gal.

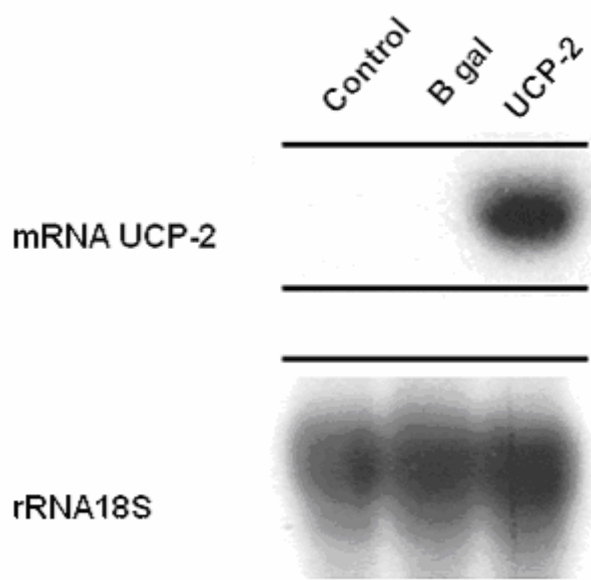


Figura 12. Determinación de los niveles de mRNA de UCP2 en hepatocitos de rata Wistar no infectados, infectados con adenovirus β gal y con adenovirus UCP2. RNA total (20 μ g/pocillo) se sometió a electroforesis en geles de agarosa (1,2%) y se transfirió a membranas de nylon. Las hibridaciones se llevaron a cabo usando el cDNA completo de la UCP2, marcado radiactivamente con dCTP[α -P32] por cebamiento al azar ("random priming").

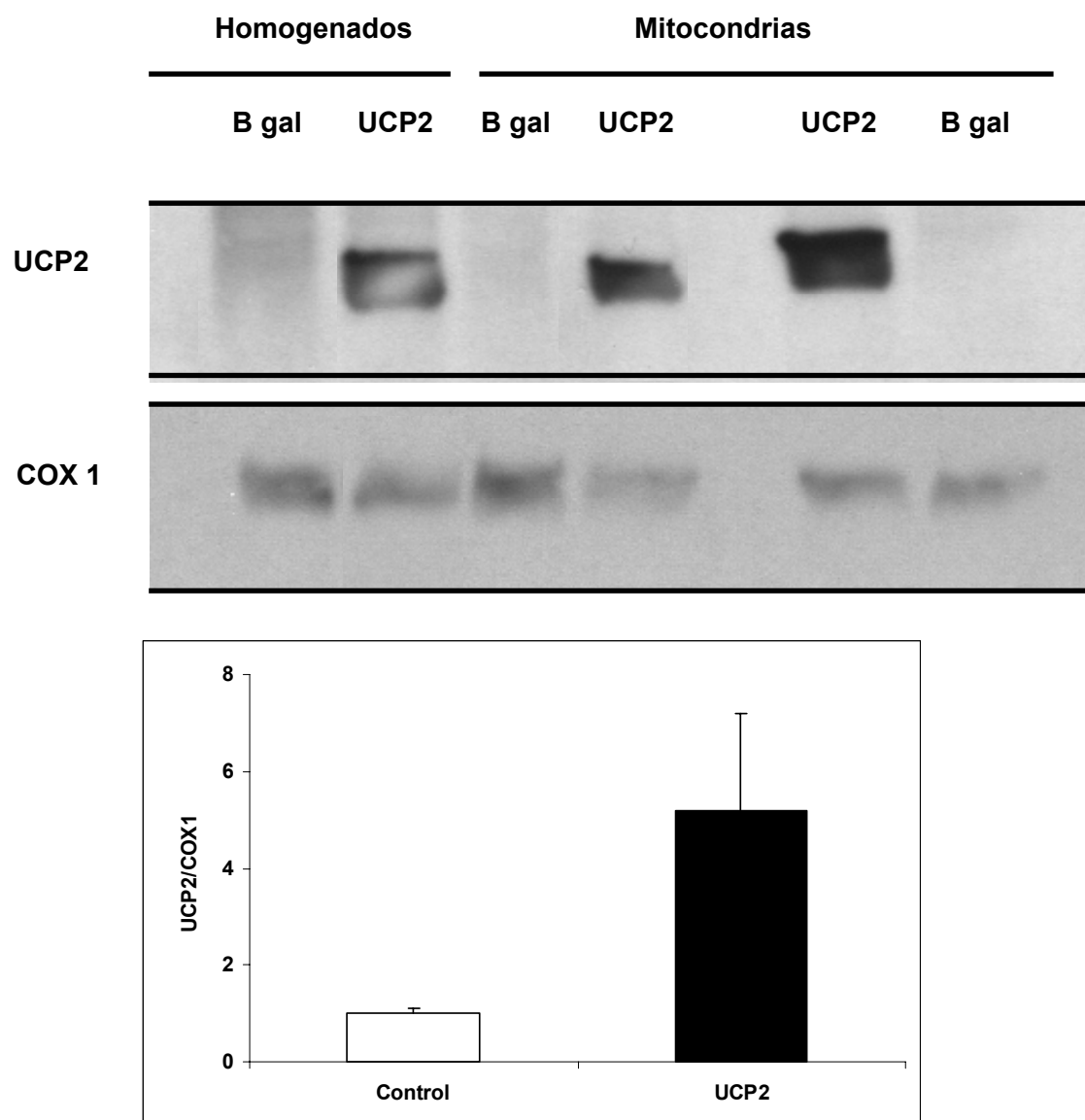


Figura 13. Niveles de la proteína UCP2 en homogenados y mitocondrias de hepatocitos infectados con adenovirus β gal y con adenovirus UCP2. Los homogenados y extractos de proteínas mitocondriales (36 μ g/pocillo) fueron separados mediante electroforesis en geles de poliacrilamida 10% en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) y analizados por inmunoblot con anticuerpos anti-UCP2 y anti-COX1 que se llevó de control (ver Materiales y Métodos).

4.5.2 Análisis de la funcionalidad de la proteína hUCP2 expresada en hepatocitos de rata en cultivo primario

La funcionalidad de la proteína hUCP2 expresada en hepatocitos en cultivo primario se llevó a cabo por la determinación del consumo de O₂ y el potencial de membrana en preparaciones de mitocondrias aisladas de hepatocitos infectados o no con AdUCP2 y Adβgal

Tal como muestra la **Tabla 4** el consumo de O₂ en presencia de 10 mM succinato por las mitocondrias obtenidas de hepatocitos en cultivo que expresan el gen hUCP2 fue 54% mayor que el consumo de O₂ medido en mitocondrias obtenidas de hepatocitos infectados con el Adβgal (respectivamente, 18,3 ± 1,3 vs. 11,89 ± 0,5 nmoles O₂/ mg proteína x min; p< 0,001; n = 5 experimentos). No se observaron diferencias significativas en el consumo de O₂ entre mitocondrias aisladas de hepatocitos infectados con Adβgal o no infectados. Como cabía esperar, la adición de ADP (180 μM) al medio de incubación incrementó el consumo de O₂ por las mitocondrias aisladas tanto de hepatocitos control como de hepatocitos infectados con el Adβgal (un 42% y un 58%, respectivamente). Sin embargo, el ADP careció de efecto estadísticamente significativo en las mitocondrias que expresan la proteína hUCP2. Lo cual indica que en estas mitocondrias la velocidad de consumo de O₂ ha perdido el componente de regulación por ADP.

Cuando las mitocondrias aisladas se incubaron conjuntamente con succinato y el agente desacoplante FCCP se observó un marcado incremento (del 96 al 100%) en el consumo de O₂, tanto en los hepatocitos control como en los que expresan βgal, en relación con el consumo de O₂ observado en incubaciones realizadas sólo en presencia de succinato. Por otro lado, el FCCP aumentó sólo un 48 % el consumo de O₂ en mitocondrias que expresan hUCP2 en relación con el consumo detectado en estas mismas mitocondrias incubadas sólo con succinato. No existieron diferencias significativas entre el consumo de O₂ detectado en los tres tipos de mitocondrias en incubaciones llevadas a cabo en presencia de succinato y FCCP, lo que indica niveles máximos de consumo de O₂ semejantes tras el desacoplamiento total provocado por el FCCP en las mitocondrias aisladas tanto de hepatocitos control no infectados como los que expresan βgal y UCP2.

Tabla 4. Consumo de O₂ en mitocondrias aisladas de hepatocitos de rata Wistar no infectados, infectados con adenovirus β gal y con adenovirus UCP2.

Consumo de O₂ (nmoles O₂ x mg⁻¹ x min⁻¹)			
	Succinato (10mM)	Succinato (10mM) + ADP (180 μM)	Succinato (10mM) + FCCP (2 μM)
Control	11.1 ± 0.54	15.87 ± 0.7 ***	22.2 ± 2.6***
β gal	11.89 ± 0.5 ^{ns}	18.9 ± 1.2***	23.3 ± 2.7***
UCP2	18.3 ± 1.3 ^{†††}	15.8 ± 1.2 ^{ns}	27.2 ± 2.9**

Mitocondrias aisladas de hepatocitos de rata Wistar no infectados, infectados con adenovirus β gal o con adenovirus UCP2 fueron incubadas con los compuestos indicados, a 37°C durante 8 minutos. El consumo de O₂ se midió usando un electrodo de Clark. Los valores son la media ± E.E.M. de cinco experimentos independientes de diferentes animales. Significación estadística de las diferencias: **p<0.01 y ***p<0.001, en relación con su correspondiente valor de succinato; ††† p<0.001 y ^{ns}: no significativo, en relación con sus correspondientes valores control.

Cuando se midió el potencial de membrana por la técnica de la rodamina 123 en mitocondrias aisladas (**Figura 14**) se observó como en aquellas obtenidas de hepatocitos infectados con Adβgal el potencial de membrana basal obtenido en presencia de succinato se incremento en un 65% cuando se adicionó ADP 180 μM al medio de incubación, algo que iría en concordancia con el aumento del cociente respiratorio antes observado. Cuando en vez de ADP se incorporó GDP 0,5 mM se observó que el potencial de membrana basal (medido en presencia de succinato) no cambió significativamente.

Sin embargo, el potencial basal de membrana de las mitocondrias que expresan la proteína hUCP2 incubadas con succinato fue significativamente inferior (87%) respecto al potencial basal de membrana medido en las mitocondrias aisladas de

hepatocitos infectados con Ad β gal. Este potencial de membrana no se modificó con la presencia adicional de ADP en el medio de incubación. No obstante, la adición de GDP (conocido inhibidor de la actividad desacoplante de las proteínas UCPs) revirtió sólo parcialmente la disminución del potencial de membrana observado en las mitocondrias aisladas de hepatocitos infectados con AdUCP2.

Estos resultados sugieren que la expresión de la proteína UCP2 en mitocondrias aisladas de hepatocitos infectados con AdUCP2 presentan cierto grado de desacoplamiento de la fosforilación oxidativa, que se manifiesta en un aumento significativo del consumo de O₂ y una disminución del potencial de membrana mitocondrial. El hecho de que los cambios en el potencial de membrana provocado por la expresión de UCP2 en las mitocondrias no se vea totalmente revertido por la acción del GDP (conocido inhibidor alostérico de la acción desacoplante de las UCPs), sugiere que al menos en parte el desacoplamiento producido por la expresión de UCP2 no está relacionado con su actividad funcional. En este sentido, aunque no lo hemos estudiado, alteraciones en la topología de la membrana interna por la sobreexpresión de UCP2 podría colaborar a exagerar el desacoplamiento mitocondrial de un modo no específico (no inhibible por GDP).

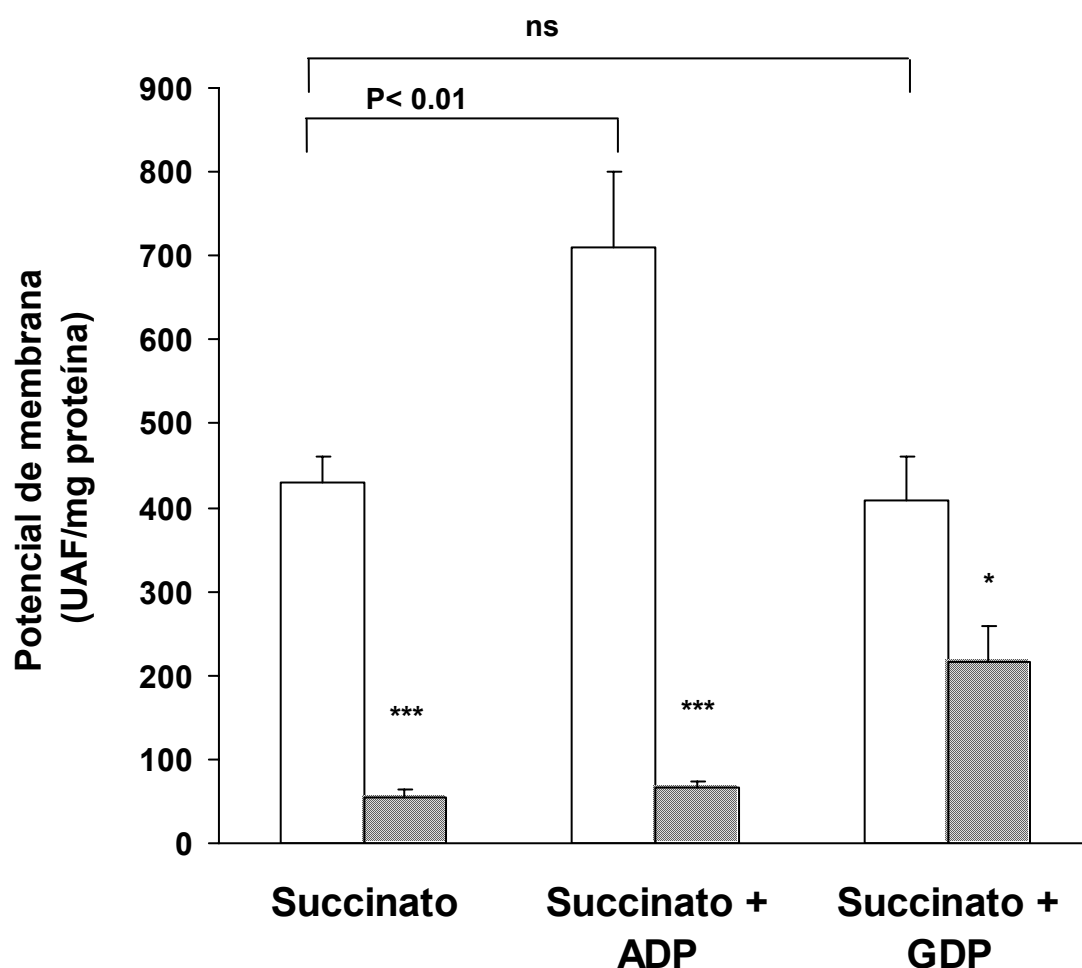


Figura 14. Potencial de membrana en mitocondrias aisladas de hepatocitos de rata Wistar infectados con adenovirus β gal y adenovirus UCP2. Mitocondrias aisladas de hepatocitos de rata Wistar infectados con adenovirus β gal y adenovirus UCP2 fueron incubadas con 10 mM succinato –en presencia y ausencia de 180 μ M ADP o 0.5 mM GDP- y con la sonda fluorescente rodamina 123, a 37°C, durante 8 minutos. Como medida de la entrada inespecífica de rodamina se utilizó como control el agente desacoplador FCCP. La fluorescencia obtenida con FCCP fue restada a las restantes medidas obtenidas. La significación estadística de las diferencias se expresa como: ***p < 0.001, *p < 0.05, ns: no significativo, en relación a sus correspondientes controles. \square β gal; \blacksquare UCP2

4.5.3 Niveles de nucleótidos de adenina en hepatocitos de rata en cultivo primario que expresan hUCP2

Según cabe esperar, el efecto desacoplante de la proteína UCP2 observado en estudios *in vitro* en mitocondrias aisladas tendría que repercutir sobre los niveles celulares de nucleótidos de adenina, en caso de que este efecto desacoplante se diera también en células intactas. Así, tal como muestra la **Tabla 5**, los niveles de ATP disminuyeron significativamente un 26 % con respecto a los valores obtenidos en hepatocitos infectados con Ad β gal (respectivamente, $18 \pm 1,4$ vs. $24,45 \pm 2,3$ μ mol/g proteína; $P < 0,05$; $n = 5$ experimentos). Esta disminución en los niveles de ATP observada en los hepatocitos que expresan UCP2 se acompañó de un incremento (18%) en los niveles celulares de AMP, en relación con los medidos en hepatocitos infectados con Ad β gal, si bien esta diferencia no fue estadísticamente significativa. En cuanto a los niveles de ADP medidos en los hepatocitos, no se observaron diferencias significativas entre ninguno de los grupos estudiados.

Por otro lado, cuando se calculó el valor de la carga energética (\bar{e}) ésta fue de $0,91 \pm 0,02$ en los hepatocitos control no infectados e infectados con Ad β gal, disminuyendo ligeramente pero de un modo no estadísticamente significativo en los hepatocitos infectados con AdUCP2 ($0,88 \pm 0,2$).

Estos resultados sugieren que la expresión de la proteína hUCP2 en hepatocitos de rata en cultivo primario, si bien es capaz de provocar un desacoplamiento importante de la fosforilación oxidativa tal como hemos observado en los estudios llevados a cabo en mitocondrias aisladas, sólo disminuye en un 26% los niveles celulares de ATP sin afectar significativamente la concentración de ADP y AMP ni la carga energética.

Tabla 5. Niveles de ATP, ADP, AMP en hepatocitos de rata Wistar no infectados, infectados con adenovirus β gal o con adenovirus UCP2.

Nucleótidos de adenina ($\mu\text{mol/gr}$ proteína)			
Hepatocitos	Control	β gal	Ucp2
ATP	25.29 ± 3.6	24.45 ± 2.3	$18 \pm 1.4^*$
ADP	2.64 ± 0.14	2.83 ± 0.2	2.56 ± 0.3
AMP	0.85 ± 0.18	0.96 ± 0.15	1.14 ± 0.2
(\bar{e})	0.91 ± 0.02	0.91 ± 0.01	0.88 ± 0.02

Una vez transcurridas 24 horas de la infección hepatocitos de rata en cultivo fueron rápidamente congelados en N_2 y procesados como se describe en *Materiales y Métodos*. La carga energética (\bar{e}) se calculó con la fórmula: $[\text{ATP}] + \frac{1}{2} [\text{ADP}] / [\text{ATP}] + [\text{ADP}] + [\text{AMP}]$. Los valores corresponden a las medias \pm E.E.M. de cinco experimentos. La significación estadística de las diferencias se expresa como: $*p < 0.05$, en relación a su correspondiente valor control.

4.5.4 Estudio del metabolismo de la glucosa en hepatocitos de rata en cultivo primario que expresan hUCP2

Como hemos visto anteriormente, el efecto desacoplante de la expresión de UCP2 en hepatocitos en cultivo se manifiesta en una ligera disminución de los niveles

celulares de ATP. Con objeto de explorar el estado del metabolismo de la glucosa en los hepatocitos que sobreexpresan UCP2 nos propusimos estudiar el destino metabólico de glucosa marcada radiactivamente ($[U-^{14}C]$ glucosa) y su conversión en $[^{14}C]CO_2$, $[^{14}C]$ glucógeno y lactato. Para ello, incubamos hepatocitos no infectados o infectados con Ad β gal o AdUCP2 en medio Krebs Ringer bicarbonato Hepes en presencia de $[U-^{14}C]$ glucosa 20mM (1 μ Ci/ placa) y medimos su conversión en lactato, $[^{14}C]CO_2$ y $[^{14}C]$ glucógeno.

Como se muestra en la **Tabla 6**, la expresión de UCP2 en hepatocitos produjo un aumento significativo (79%) en la producción de $[^{14}C]CO_2$ a partir de $[U-^{14}C]$ glucosa, con respecto a los hepatocitos infectados con Ad β gal ($0,127 \pm 0,01$ vs. $0,071 \pm 0,003$ μ mol de glucosa convertidos a CO_2 / mg prot x 4 horas, respectivamente.; $p < 0,01$; $n=4$). Al mismo tiempo, observamos una disminución significativa (51%) en la producción de lactato en los hepatocitos que expresan UCP2, frente a la producción de lactato en hepatocitos infectados con Ad β gal ($0,81 \pm 0,04$ vs. $1,21 \pm 0,15$ μ mol de glucosa convertidos a lactato/ mg prot. x 4 horas, respectivamente; $P < 0,05$; $n=4$). Por el contrario, la expresión de UCP2 en hepatocitos no modificó significativamente la conversión de $[U-^{14}C]$ glucosa en $[^{14}C]$ glucógeno, con respecto a la observada en hepatocitos infectados con Ad β gal. Hay que indicar que los cambios observados son independientes de la propia infección por el adenovirus como tal, dado que ninguno de estos parámetros fue significativamente diferente entre hepatocitos controles no infectados y los infectados con Ad β gal.

Estos resultados indican que la expresión de UCP2 en hepatocitos estimula el metabolismo oxidativo de manera que aumenta la conversión de glucosa en CO_2 . Ello estaría a favor de un aumento de la respiración como resultante de un posible efecto desacoplante del UCP2 en hepatocitos intactos. Al mismo tiempo el aumento del metabolismo oxidativo de la glucosa se acompaña -como era de esperar- de una menor formación de lactato.

También se estudió la influencia de la expresión de UCP2 en hepatocitos sobre la velocidad del flujo gluconeogénico. Para ello se midió la producción de glucosa a partir de una mezcla de $[U-^{14}C]$ lactato/piruvato, en hepatocitos de rata en cultivo primario infectados con Ad β gal o AdUCP2. Para ello, los hepatocitos en cultivo se incubaron con medio Krebs Ringer bicarbonato Hepes en presencia de la mezcla de precursores gluconeogénicos $[U-^{14}C]$ lactato/piruvato (10/1 mM; 0,25 μ Ci/mmol) y se estudio la formación de $[^{14}C]$ glucosa, tras una incubación del cultivo celular de 4 horas, a 37°C. Los resultados presentados en la **Tabla 7** muestran como la expresión

de UCP2 produjo una disminución significativa (71,6 %) en la producción de [^{14}C]glucosa en relación con los hepatocitos infectados con Ad β gal ($3,33 \pm 0,75$ vs. $11,72 \pm 1,8$ $\mu\text{mol/g}$ células x 4 horas $P=0,01$; $n=3$). Sin embargo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en la producción de [^{14}C]glucosa entre los hepatocitos control no infectados y los infectados con el Ad β gal ($8,52 \pm 1,07$ vs. $11,72 \pm 1,8$ $\mu\text{mol/g}$ células x 4 horas $P=0,01$; $n=3$). Esto último indica, que la inhibición de la gluconeogénesis observada en los hepatocitos de rata infectados con AdUCP2 es específica e independiente de la infección con adenovirus.

Tabla 6. Destino metabólico de la glucosa en hepatocitos de rata Wistar no infectados, infectados con adenovirus β gal y con adenovirus UCP2.

Glucosa convertida ($\mu\text{mol/mg}$ proteína)			
Hepatocitos	Control	β gal	Ucp2
[^{14}C]CO ₂	0.074 ± 0.004	$0.071 \pm 0.0035^{\text{ns}}$	$0.127 \pm 0.01^{**}$
Lactato	1.13 ± 0.13	$1.21 \pm 0.15^{\text{ns}}$	$0.81 \pm 0.042^*$
[^{14}C]Glucógeno	0.040 ± 0.0076	$0.028 \pm 0.003^{\text{ns}}$	0.021 ± 0.002

La infección de los hepatocitos con los adenovirus y los ensayos de producción de [^{14}C]CO₂, [^{14}C]glucógeno y lactato a partir de [U^{14}C]glucosa se realizaron como se indica en *Materiales y Métodos*. Los valores corresponden a las medias \pm E.E.M. de cuatro experimentos. La significación estadística de las diferencias se expresa como: $^{**}p<0.01$, $^*p<0.05$; en relación a su correspondiente valor β gal. ns: no significativo en relación a su correspondiente valor control.

Tabla 7. Producción de [^{14}C]glucosa a partir de [^{14}C]lactato/piruvato en hepatocitos de rata Wistar no infectados, infectados con adenovirus β gal o con adenovirus UCP2.

[^{14}C] Glucosa ($\mu\text{moles/g}$ cél x 4 horas)			
Hepatocitos	Control	β gal	UCP2
	11.72 \pm 1.8	8.52 \pm 1.07	3.33 \pm 0.75 ^{+ **}

Los valores corresponden a las medias \pm E.E.M. de cuatro experimentos. La significación estadística de las diferencias se expresa como: ** $p < 0.01$; en relación a su correspondiente valor β gal. ⁺ $p < 0.05$, en relación a su correspondiente valor control.

DISCUSIÓN

5 DISCUSIÓN

5.1 Fenotipo metabólico del ratón transgénico que sobreexpresa hUCP2 en hígado.

La UCP2 es una proteína desacoplante ampliamente distribuida en los tejidos de los animales superiores (Fleury et al. 1997; Gimeno et al. 1997; Ricquier and Bouillaud 2000; Alan et al. 2009) que ha sido implicada en la modulación de la termogénesis y del metabolismo basal (Bouchard et al. 1997; Barbe et al. 1998). Además, la proteína UCP2 parece jugar un papel destacado en el control del metabolismo de la glucosa y de los lípidos (Pecqueur et al. 2009). También se ha puesto en evidencia una relación inversa entre el grado de expresión de las diferentes proteínas desacoplantes (UCP1, UCP3) y el desarrollo de obesidad y diabetes tipo II (Kontani et al. 2005; Costford et al. 2006).

En el hígado son las células no parenquimatosas y las de Kupffer las que expresan cantidades significativas de mRNA de UCP2, en condiciones normales. (Larrouy et al. 1997). Sin embargo, se ha detectado expresión de mRNA de UCP2 en hepatocitos tratados con lipopolisacárido bacteriano o ácidos grasos libres (Cortez-Pinto et al. 1998; Cortez-Pinto et al. 1999; Ruzicka et al. 2005).

Con objeto de profundizar en la fisiopatología de la UCP2 y su posible implicación en el metabolismo de la glucosa y en el desarrollo de obesidad, hemos desarrollado, en colaboración con el laboratorio de la Dra. Fátima Bosch en el Centro de Biotecnología Animal y Terapia Génica de la Universidad Autónoma de Barcelona, un ratón transgénico que sobreexpresa la UCP2 humana (hUCP2) en hígado. También, hemos desarrollado un modelo celular de hepatocitos en cultivo primario que sobreexpresan UCP2 tras ser infectados con adenovirus portadores del gen hUCP2.

Los primeros estudios se centraron en la caracterización fenotípica de los ratones transgénicos obtenidos. Esta caracterización se inició con la detección del gen quimérico PEPCK/hUCP2 mediante la técnica de Southern blot (**Figura 1**) observándose por análisis del DNA de los ratones transgénicos una banda de 5Kb (gen endógeno de UCP2) y otra de 0,8 kb (transgén). Sin embargo, en los animales controles sólo se observa una banda de 5 Kb correspondiente al gen endógeno UCP2. Además, demostramos una correlación entre la presencia del transgén y la expresión del mRNA de hUCP2 en el hígado de ratones transgénicos (**Figura. 2**). Hay que destacar que -de acuerdo con lo descrito en la literatura- en el hígado de los animales

controles no se detectó expresión del mRNA de UCP2 (Nobuyo Tsuboyama kasaoka 2008)

Sin embargo, es importante resaltar que la expresión del mRNA de las UCPs en un tejido específico no necesariamente se correlaciona con la expresión de las correspondientes proteínas UCPs (Sivitz et al. 1999; Pecqueur et al. 2001). Por esta razón, era crucial confirmar la expresión de hUCP2 también a nivel de proteína. Para ello, decidimos analizar por Western blot la presencia de hUCP2 en mitocondrias aisladas de hígado de ratones transgénicos.

La principal dificultad de este análisis fue que los anticuerpos específicos anti-UCP2 presentes en el mercado presentaban una especificidad muy baja (Saleh et al. 2002). Sin embargo, conseguimos obtener buenos resultados utilizando el anticuerpo anti-UCP2 de Calbiochem (Ref. 662047). En los análisis por Western blot realizados en mitocondrias aisladas de ratones transgénicos se observó que efectivamente se expresaba la proteína UCP2, ya que aparecía una banda específica a la altura de 32-kDa, tamaño correspondiente a la UCP2 (Fleury et al. 1997) (**Figura 3**). Esta banda no se detectó en las mitocondrias obtenidas de hígados de animales controles.

Hay que mencionar que la expresión de la proteína hUCP2 fue significativamente menor en los animales transgénicos alimentados y que su expresión se incrementó por el ayuno de 24 h y aún más por el ayuno de 48h. Estos resultados están de acuerdo con el hecho de que el promotor presente en la construcción del transgén es el promotor de la PEPCK cuya expresión se incrementa por el ayuno (Short et al. 1992; Van Remmen and Ward 1998).

A continuación, quisimos determinar si la expresión de la proteína hUCP2 en el hígado de los animales transgénicos provocaba un desacoplamiento de la fosforilación oxidativa. Datos previos de la literatura habían mostrado la capacidad desacoplante de la proteína UCP2 expresada en levaduras recombinantes (Fleury et al. 1997; Gimeno et al. 1997) y en ensayos de reconstitución en liposomas (Jaburek et al. 1999; Echtay et al. 2001; Jaburek and Garlid 2003). También se había demostrado su papel desacoplante en mitocondrias aisladas de células de insulinoma INS-1 transfectadas con adenovirus portadores del gen de UCP2 de rata (Hong et al. 2001), así como en mitocondrias aisladas de riñón (Echtay et al. 2002) o timocitos (Krauss et al. 2002) que expresan UCP2.

Así pues, con el propósito de comprobar la capacidad desacoplante de la hUCP2 expresada en el hígado de los ratones transgénicos estudiamos el consumo de oxígeno y el potencial de membrana en mitocondrias aisladas de hígado de ratones

controles y transgénicos, tras someter a ambos tipos de ratones a un ayuno previo de 24 horas. Como sustrato de la respiración se usó succinato, estudiándose también la influencia del ADP (control respiratorio) y del GDP (inhibidor alostérico de las proteínas desacoplates) sobre los mencionados parámetros, y la respuesta de estas mitocondrias al FCCP, conocido agente desacoplante.

Nuestros resultados mostraron que la sobreexpresión de hUCP2 en el hígado de los animales transgénicos provocó un efecto desacoplante de la fosforilación oxidativa mitocondrial, que se manifestó en un incremento del consumo de O₂ y un menor potencial de membrana en las mitocondrias aisladas de los hígados de animales transgénicos, en comparación con los resultados obtenidos con mitocondrias aisladas de hígados de animales controles (**Tabla 1**). Hay que mencionar que en ambos tipos de mitocondrias, las aisladas de ratones transgénicos y de controles, se mantuvo el control respiratorio por ADP, incrementándose, respectivamente el consumo de oxígeno 2,5 y 2,3 veces en presencia de este nucleótido de adenina. Por otro lado, también hay que destacar que el efecto desacoplante de la sobreexpresión mitocondrial de hUCP2 no pareció ser debido a la alteración topológica de la estructura de la membrana interna mitocondrial por esta sobreexpresión, sino a la propia función desacoplante de hUCP2. En apoyo de esta hipótesis hay que mencionar que la presencia de GDP, inhibidor alostérico de la acción desacoplante de la UCP2, revirtió completamente la disminución producida en el potencial de membrana en las mitocondrias que expresan hUCP2.

El efecto desacoplante de hUCP2 observado en estudios *in vitro* en mitocondrias aisladas tuvo también su manifestación *in vivo* en el hígado de ratones transgénicos. Así, en el hígado de los animales transgénicos ayunados 24 ó 48 h, el efecto desacoplante se manifestó con una disminución significativa de los niveles de ATP (22,7% y 41,1% respectivamente, en hígados de animales transgénicos ayunados 24 o 48h), un aumento simultáneo de los niveles de AMP y una disminución de la carga energética, en relación con lo observado en hígados de los correspondientes animales controles. Todo lo anterior indica que la expresión de la proteína hUCP2 en el hígado de animales transgénicos se acompaña de un efecto desacoplante “*in vivo*” de la fosforilación oxidativa mitocondrial en el hígado de estos animales, que provoca una disminución de la concentración de ATP y de la carga energética en el hígado.

Estos resultados están en concordancia con el aumento del desacoplamiento de la fosforilación oxidativa observado por el grupo de Shang en mitocondrias aisladas de ratones transgénicos que sobreexpresan UCP2 en hígado. Asimismo, estos autores

observan una disminución significativa del contenido de ATP, y un aumento de AMP en los hígados de los ratones transgénicos, en comparación con lo observado en ratones controles (Shang et al. 2009). De modo similar, otros grupos muestran que la sobreexpresión de UCP1 en el hígado de ratones transgénicos o de células HepG2, se acompaña de un aumento de la respiración mitocondrial y de una caída de los niveles hepáticos y celulares de ATP, consecuencia del efecto desacoplante de la sobreexpresión de UCP1 (Gonzalez-Muniesa et al. 2005; Gonzalez-Muniesa et al. 2006).

En paralelo a la realización de estos estudios, surgieron evidencias en la literatura que cuestionaban la utilización de sistemas de sobreexpresión para el estudio de la actividad desacoplante de las UCPs. Así, en algunos casos se demostraba la existencia de un desacoplamiento artefactual en levaduras y en células de mamífero, como consecuencia indirecta de la expresión de gran cantidad de proteína UCP en la membrana mitocondrial interna. Así, observaron que las mitocondrias aisladas de levaduras que sobreexpresaban UCP3 mostraban un desacoplamiento de la fosforilación oxidativa que no se inhibía por GDP (Heidkaemper et al. 2000).

Del mismo modo, otro grupo observó que la expresión de altos niveles de UCP1 de rata en *Saccharomyces Cerevisiae* (aproximadamente 11 µg/mg de proteína mitocondrial) producía alteración en la velocidad de crecimiento celular, depresión de la respiración en mitocondrias aisladas y un aumento de la conductancia de protones que fue parcialmente insensible a GDP (Stuart et al. 2001). Resultados similares se obtuvieron al sobreexpresar UCP3 en *Saccharomyces Cerevisiae* (Harper et al. 2002) o en células L6 derivadas de músculo esquelético (Guerini et al. 2002).

Sin embargo, en nuestro caso el efecto desacoplante –medido por el potencial de membrana mitocondrial– se revertía totalmente con GDP (inhibidor alostérico específico de la actividad desacoplante de la UCP2) (**Figura 4**). Ello claramente indicaba que –en nuestro caso– el efecto desacoplante de la hUCP2 no era debido a una alteración topológica de la membrana interna mitocondrial, sino a la propia función específica desacoplante de la UCP2.

No obstante, hay estudios en mitocondrias de bazo y pulmón aisladas de ratones controles y KO UCP2, dos órganos con altos niveles de UCP2 (Pecqueur et al. 2001), que no apoyan la actividad desacoplante de la proteína UCP2 in vivo (Couplan et al. 2002). Además, resultados obtenidos en líneas celulares e islotes pancreáticos de

ratones transgénicos que sobreexpresan UCP2 tampoco apoyan la actividad desacoplante de la proteína UCP2 (Produit-Zengaffinen et al. 2007), sin que podamos explicar estas discordancias.

5.2 Influencia de la dieta sobre el fenotipo metabólico del ratón transgénico que sobreexpresa hUCP2 en hígado

A continuación pasamos a estudiar las alteraciones metabólicas asociadas a la sobreexpresión hepática de UCP2 en los animales transgénicos, en comparación con sus correspondientes ratones controles. En este sentido hay que mencionar que diferentes estudios apuntan que la UCP2 podría estar involucrada en la regulación del peso corporal, ya que su localización cromosómica tanto en ratones como en el hombre coincide con una región que, por análisis de ligamiento se halla fuertemente asociada a la obesidad y a la diabetes tipo II (Fleury et al. 1997; Solanes et al. 1997; Warden 1999). Además en los últimos años se han realizado numerosos estudios sobre las variantes genéticas de la UCP2 y su contribución a la regulación del peso corporal (Chen et al. 2007; Ochoa et al. 2007; Lee et al. 2008).

Por otro lado, diferentes estudios han implicado a las UCPs en la capacidad de utilización de glucosa, en la aparición de resistencia a la insulina, e incluso en la regulación de la secreción de insulina por la célula beta pancreática (Fritz et al. 2006; Affourtit and Brand 2008). Así, se ha propuesto que un aumento de la expresión de las UCPS podría aportar una defensa frente a la obesidad y la consiguiente diabetes que con frecuencia la acompaña (Clapham et al. 2000; Esterbauer et al. 2001; Ishigaki et al. 2005).

Con estos antecedentes, pasamos a estudiar si la sobreexpresión hepática de UCP2 podía afectar la evolución del peso corporal a lo largo del tiempo y, también, la respuesta glucémica a una sobrecarga de glucosa o de insulina, en animales transgénicos alimentados con una dieta estándar (A04 Panlab) durante tres meses.

Al estudiar la evolución del peso corporal en animales controles y transgénicos heterocigotos, ambos alimentados con una dieta estándar, observamos que el peso de los ratones transgénicos era siempre inferior al de los animales controles, a lo largo de los tres meses que duró el seguimiento, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas (**Figura 5A**). Además, tampoco observamos diferencias significativas entre los incrementos del peso a lo largo del tiempo, entre ratones transgénicos heterocigotos y controles (**Figura 5B**).

Cuando estudiamos la respuesta glucémica tras una sobrecarga de glucosa en ratones controles y transgénicos ayunados 24 o 48 h, no observamos diferencias estadísticamente significativas en los niveles máximos de glucemia alcanzados, ni en el perfil de las curvas obtenidas a lo largo de las dos horas que duraba la prueba (**Figura 6**). No obstante, hay que mencionar que en el caso de los animales ayunados 48 horas, en los que la expresión del transgén UCP2 está significativamente incrementada (ver **Figura 3**), los valores de glucemia en los ratones transgénicos fueron inferiores a los valores medidos en los ratones controles, a todos los tiempos ensayados, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas.

Por otro lado, cuando se estudió la tolerancia a la insulina, tampoco observamos diferencias estadísticamente significativas en la respuesta hipoglucémica, entre ratones transgénicos heterocigotos y ratones controles, obteniéndose curvas prácticamente superponibles (**Figura 7**).

Nuestros resultados indicaban que la sobreexpresión de hUCP2 en el hígado de ratones transgénicos no parecía afectar significativamente el peso corporal, ni la tolerancia a la glucosa ni tampoco la sensibilidad a la insulina, en relación con lo observado en los animales controles, tras tres meses sometidos a una dieta estándar.

Estos resultados no parecían apoyar un papel relevante de la expresión de UCP2 en el hígado en cuanto a la modulación del metabolismo intermediario de la glucosa y la sensibilidad a la insulina, en la situación de una alimentación “normal”, no hipercalórica. En cierta forma, nuestros resultados presentan cierta coherencia con los obtenidos en ratones carentes de UCP2 (“knock out” para UCP2), en los que la ausencia de esta proteína desacoplante no afecta al peso corporal. (Arsenijevic et al. 2000; Zhang et al. 2001). Estos autores sugieren que UCP2 no regula el peso corporal, o que mecanismos alternativos compensan la ausencia de UCP2, aunque no detectaron aumento de la expresión de mRNA de UCP3 en corazón, músculo o TAB, ni tampoco de mRNA de UCP1 en TAM.

Sin embargo, una serie de evidencias apoyaban que un aumento de la expresión de las UCPS podría aportar una defensa frente a la obesidad, así como frente a la intolerancia a la glucosa y la resistencia a la insulina, que frecuentemente la acompañan. En este sentido han descrito la creación de un ratón transgénico que sobreexpresa UCP3 en músculo (Clapham et al. 2000). Este ratón es hiperfágico, pero con un peso menor que el de los correspondientes controles; también muestra una marcada disminución de su tejido adiposo, y unos niveles plasmáticos de glucosa e insulina disminuidos, a la par que una velocidad de consumo de glucosa acelerada.

Asimismo, Ishigaki et al (2005) han observado que la expresión de UCP1 en el hígado de ratones transgénicos, sometidos a una dieta alta en lípidos que les ocasiona obesidad y diabetes, muestran un aumento del metabolismo basal, un descenso de su peso corporal y de su contenido graso en hígado y tejido adiposo y una menor resistencia a la insulina, en relación con sus correspondientes animales controles también sometidos a una dieta alta en lípidos. En relación con lo anterior, se ha demostrado que la existencia en humanos de un polimorfismo G/A en el promotor de UCP2 se asocia con una expresión aumentada de su mRNA en tejido adiposo, que se asocia con una modesta reducción en la prevalencia de obesidad entre los portadores de este polimorfismo (Esterbauer et al. 2001). Todo lo anterior, junto con otras evidencias ha centrado considerablemente el interés en las UCPs como dianas terapéuticas en la obesidad (Jastroch et al.; Crowley and Vidal-Puig 2001; Mattiasson and Sullivan 2006)

En relación con esto, nos planteamos estudiar la influencia de la expresión hepática de UCP2 en el desarrollo de obesidad provocada por una dieta alta en lípidos (TD 88137, Harlan Teklad). Con estos estudios pretendíamos demostrar si los ratones transgénicos que expresan hUCP2 en el hígado eran más resistentes al desarrollo de obesidad, como cabría esperar si tuvieran un mayor gasto energético basal y una mayor termogénesis en respuesta a la dieta. Para ello, se alimentaron durante tres meses ratones transgénicos heterocigotos y controles con una dieta alta en lípidos (TD 88137, Harlan Teklad), llevando como comparación ratones transgénicos heterocigotos y controles sometidos a una dieta estándar (A04, Panlab).

Tal como habíamos descrito anteriormente (**Figura 5**), no se observaron diferencias significativas en el incremento de peso observado en animales transgénicos y controles sometidos a una dieta estándar (**Figura 8**), ni en la tolerancia a la glucosa, ni en la sensibilidad a la insulina (**Figuras 9 y 10**).

Sin embargo, cuando los animales fueron alimentados con una dieta alta en lípidos, el incremento de peso a lo largo de los tres meses que duró la prueba fue significativamente menor en los animales transgénicos que en los controles (**Figura 8**). Así, después de tres meses con dieta alta en lípidos, el peso alcanzado por los ratones controles fue de $9,07 \pm 0,76$ g, mientras que el peso de los ratones transgénicos fue de $6,33 \pm 0,9$ g.

Estos resultados indicaban que la sobreexpresión de UCP2 en el hígado de los ratones transgénicos era capaz de contrarrestar el desarrollo de obesidad ligada a la dieta alta en lípidos. Nuestros resultados están de acuerdo con el desarrollo de

resistencia a la obesidad inducida por una dieta alta en lípidos o bien por una dieta de cafetería, en ratones transgénicos que sobreexpresan UCP1 en tejido adiposo blanco y marrón o en músculo esquelético. (Kopecky et al. 1996; Kozak and Harper 2000; Li et al. 2000), o bien sobreexpresan UCP3 en el músculo esquelético (Clapham et al. 2000; Tiraby et al. 2007). Por otra parte, está ampliamente establecido que la obesidad inducida en ratones por una dieta alta en lípidos está asociada con una homeostasis de la glucosa alterada, observándose intolerancia a la glucosa y resistencia a la insulina (Surwit et al. 1988; Surwit et al. 1991), que a su vez se acompaña de hiperglucemia e hiperinsulinemia (Matsuda et al. 1997; Guerre-Millo et al. 2001).

La hiperinsulinemia inducida por la dieta alta en lípidos se suele considerar como una respuesta compensatoria de la célula beta pancreática al desarrollo de resistencia a la insulina que afecta tanto a tejidos periféricos (músculo esquelético y tejido adiposo) como al hígado (Buettner et al. 2007).

Con objeto de estudiar si la sobreexpresión de hUCP2 en el hígado de los animales transgénicos era capaz de proteger de la aparición de intolerancia a la glucosa y de resistencia a la insulina que provoca una dieta alta en lípidos, se estudió la respuesta glucémica de ratones transgénicos UCP2 y en sus correspondiente ratones controles, tras una sobrecarga de glucosa y tras la administración de insulina.

Así, en los animales alimentados con una dieta alta en lípidos, se observó como los ratones transgénicos presentaban una glucemia basal ligeramente inferior a la de los ratones controles, aunque la diferencia no era estadísticamente significativa ($133,6 \pm 7,7$ vs. $153,3 \pm 11$ mg/dl, para animales transgénicos y controles, respectivamente; $n=14$ animales en cada grupo) (**Figura 9**). Del mismo modo, los valores de glucemia alcanzados tras la sobrecarga de glucosa fueron inferiores en los animales transgénicos, en relación con los valores de glucemia alcanzados en los ratones controles, a lo largo de toda la prueba, aunque las diferencias sólo fueron estadísticamente significativas en el tiempo 30 min ($275,8 \pm 14,9$ vs. $320,5 \pm 14,6$ mg/dl, para animales transgénicos y controles, respectivamente; $p<0,05$). (**Figura 9**).

Cuando se estudió la sensibilidad a la insulina, los animales controles alimentados con una dieta alta en lípidos presentaron, como era de esperar, una clara resistencia a la acción de la insulina, en relación con los ratones controles alimentados con una dieta estándar, con una significativamente menor respuesta hipoglucémica (**Figura 10**). Por otro lado, los animales transgénicos alimentados con dieta alta en lípidos fueron más sensibles a la acción de la insulina que los correspondientes animales controles, presentando valores de glucemia inferiores durante los primeros

45 minutos de duración de la prueba. Las diferencias en la glucemia entre animales controles y transgénicos alimentados con HFD fueron estadísticamente significativas para el tiempo 15 minutos tras la administración de insulina (**Figura 10**).

Todos estos resultados indican que los animales transgénicos que sobreexpresan hUCP2 en hígado presentan resistencia a desarrollar intolerancia a la glucosa en respuesta a una dieta alta en lípidos, en comparación con los animales controles. Asimismo, la resistencia a la insulina provocada por este tipo de dieta es significativamente menor en los animales transgénicos. Todo ello indica que la sobreexpresión de UCP2 en hígado de ratones transgénicos supone una protección ante el desarrollo de obesidad, así como de intolerancia a la glucosa y de resistencia a la insulina, que acompaña a la alimentación con una dieta hiperlipídica.

Nuestros resultados concuerdan con lo observado en estudios previos, en los que se ha observado que la sobreexpresión de diferentes proteínas desacoplates en ratones conduce a una mejora en la sensibilidad a la insulina y resistencia a la obesidad, cuando estos se someten a una dieta alta en lípidos. Así, Li et al (2000) observaron que ratones transgénicos que sobreexpresaban UCP1 en músculo esquelético, cuando eran sometidos a una dieta alta en lípidos mostraban una disminución del contenido de tejido adiposo, niveles plasmáticos disminuidos de glucosa, insulina y colesterol, un aumento del metabolismo basal en reposo y en ejercicio, así como una mayor respuesta a la insulina y una mayor captación de glucosa en el músculo, en comparación con los ratones controles. Por otro lado, Son et al. (2004) observaron en ratones transgénicos que sobreexpresaban UCP3 en músculo esquelético, que cuando eran sometidos a una dieta estándar tendían a presentar un menor peso corporal, consumo de oxígeno y potencial de membrana mitocondrial, en comparación con los correspondientes ratones controles, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas. Sin embargo, cuando los ratones transgénicos se sometieron a una dieta alta en lípidos durante un mes, su consumo de oxígeno, su contenido en tejido adiposo epididimal y aumento de peso fue significativamente menor que en los animales controles, además de presentar una mejor curva de tolerancia a la glucosa. Resultados similares fueron también obtenidos por Tiraby et al (2007) en ratones transgénicos que duplicaban la expresión de UCP3 en músculo esquelético, al observar desacoplamiento mitocondrial y resistencia a la obesidad inducida por una dieta alta en lípidos, además de una mejor sensibilidad a la insulina, que sus correspondientes animales controles.

En cuanto a los parámetros séricos, no se apreciaron diferencias significativas en los niveles plasmáticos de glucosa, insulina, ácidos grasos libres, colesterol y triglicéridos entre animales controles y transgénicos alimentados tres meses con una dieta estándar, tanto sin ayuno previo o con ayuno de 24 horas (**Tabla 3**).

Sin embargo, en los animales controles sometidos durante tres meses a una dieta alta en lípidos, y sin ayuno previo, se observó aumento de casi 5 veces en los niveles plasmáticos de insulina, en comparación con los niveles detectados en animales controles alimentados con una dieta estándar. Este aumento de la insulinemia es un reflejo de la resistencia a la insulina que la dieta alta en lípidos provoca (Buettner et al. 2007). Sin embargo, en los ratones transgénicos con sobreexpresión hepática de hUCP2, el incremento de la insulinemia fue significativamente menor (solo de dos veces), lo que indica que la sobreexpresión de UCP2 protege de la resistencia a la insulina provocada por la dieta alta en lípidos. Del mismo modo, la glucosa en plasma -medida en animales ayunados 24 horas- que aumentó por la dieta alta en lípidos en los animales controles, fue significativamente menor en los animales transgénicos. De los restantes parámetros metabólicos medidos, los niveles de colesterol y de triglicéridos plasmáticos que aumentaron por la dieta alta en lípidos, no fueron significativamente diferentes entre animales controles y transgénicos, como tampoco lo fue el peso del tejido adiposo epididimal (**Tabla 3**).

Así pues, podemos concluir que la sobreexpresión hepática de hUCP2 en los animales transgénicos contrarresta la hiperinsulinemia y la hiperglucemia que se producen por una alimentación alta en lípidos, lo cual reafirma el efecto protector que la expresión hepática de esta proteína desacoplante tiene en la aparición de intolerancia a la glucosa y de resistencia a la insulina inducida por una dieta alta en lípidos, tal como ya se ha comentado. Todo ello a pesar de que la expresión del mRNA de la hUCP2 en el hígado de los animales transgénicos no se vió significativamente alterada tras los tres meses con dieta hiperlipídica (**Figura 11**).

5.3 Modelo celular de sobreexpresión de hUCP2 en hepatocitos de rata en cultivo primario.

En la última parte del trabajo desarrollamos un modelo celular de hepatocitos capaces de expresar el gen hUCP2, según se indica en *Materiales y Métodos*, para

estudiar *in vitro* los efectos de la sobreexpresión de este transgén sobre el metabolismo hepático de la glucosa.

En primer lugar analizamos la expresión del mRNA y de la proteína hUCP2 en los hepatocitos, confirmando así que efectivamente los hepatocitos cultivados expresaban tanto el mRNA como la proteína hUCP2 (**Figuras 12 y 13**). Una vez corroborada la presencia de hUCP2 en los hepatocitos en cultivo estudiamos si esta proteína era funcional. Para ello medimos el consumo de O₂ y el potencial de membrana en mitocondrias aisladas de los hepatocitos cultivados, así como la modulación por ADP y GDP

Así, las mitocondrias obtenidas de hepatocitos en cultivo que expresaban el gen hUCP2 mostraron un mayor (54%) consumo de O₂ que las mitocondrias obtenidas de hepatocitos infectados con el Adβgal (**Tabla 4**). La adición de ADP al medio de incubación incrementó el consumo de O₂ por las mitocondrias aisladas de hepatocitos infectados con el Adβgal (un 58%). Sin embargo, el ADP careció de efecto estadísticamente significativo en las mitocondrias que expresan la proteína hUCP2. Lo cual indica que en estas mitocondrias la velocidad de consumo de O₂ ha perdido el componente de regulación por ADP (control respiratorio por ADP). Junto a estos hallazgos, el potencial basal de membrana de las mitocondrias que expresan la proteína hUCP2 fue significativamente inferior (87%) respecto al potencial basal de membrana medido en las mitocondrias aisladas de hepatocitos infectados con Adβgal. La adición de ADP, como cabía esperar, aumentó el potencial de membrana en las mitocondrias aisladas de hepatocitos infectados con Adβgal (aprox. un 65 %). Sin embargo, careció de efecto en las mitocondrias que expresan la proteína hUCP2, lo cual concuerda con la pérdida del control respiratorio por ADP, antes observado. La adición de GDP (conocido inhibidor de la actividad desacoplante de las proteínas UCPs) no tuvo efecto sobre el potencial de membrana de las mitocondrias aisladas de hepatocitos infectados con Adβgal, y revirtió sólo parcialmente la disminución del potencial de membrana observado en las mitocondrias aisladas de hepatocitos infectados con AdUCP2.

Estos resultados muestran como la expresión de la proteína hUCP2 en mitocondrias aisladas de hepatocitos provoca desacoplamiento de la fosforilación oxidativa, que se manifiesta en un aumento significativo del consumo de O₂ y una disminución del potencial de membrana mitocondrial. La ausencia de control respiratorio por ADP, junto con el hecho de que los cambios en el potencial de membrana provocado por la expresión de UCP2 en las mitocondrias no se vea

totalmente revertido por la acción del GDP (conocido inhibidor alostérico de la acción desacoplante de las UCPs), sugiere que al menos en parte el desacoplamiento producido por la expresión de UCP2 no está relacionado con su actividad funcional. En este sentido, aunque no lo hemos estudiado, alteraciones en la topología de la membrana interna por una “masiva” sobreexpresión de UCP2 podría colaborar a exagerar el desacoplamiento mitocondrial de un modo no específico (no inhibible por GDP), que sería responsable también del tan marcado descenso del potencial de membrana observado en las mitocondrias que expresan hUCP2 (**Figura 14**), y de la pérdida del control respiratorio por ADP (**Tabla 4**). Como ya hemos comentado, estudios previos ya mencionan la posibilidad de desacoplamiento inespecífico de la fosforilación oxidativa por un exceso de sobreexpresión de proteínas UCP en la membrana interna mitocondrial en levaduras (Heidkaemper et al. 2000; Stuart et al. 2001; Harper et al. 2002) y en células en cultivo (Guerini et al. 2002).

Cuando se midieron los niveles de nucleótidos de adenina en los hepatocitos cultivados que expresaban el gen hUCP2, se observó que los niveles de ATP disminuyeron significativamente un 26 % con respecto a los valores obtenidos en hepatocitos infectados con Ad β gal (respectivamente, $18 \pm 1,4$ vs. $24,45 \pm 2,3$ μ mol/g proteína). Esta disminución en los niveles de ATP observada en los hepatocitos que expresan hUCP2 se acompañó de un incremento (18%) en los niveles celulares de AMP, en relación con los medidos en hepatocitos infectados con Ad β gal, si bien esta diferencia no fue estadísticamente significativa. En cuanto a los niveles de ADP medidos en los hepatocitos, no se observaron diferencias significativas entre ninguno de los grupos estudiados. Por otro lado, cuando se calculó el valor de la carga energética (\bar{e}) ésta fue de $0,91 \pm 0,02$ en los hepatocitos control no infectados e infectados con Ad β gal, disminuyendo ligeramente -pero de un modo no estadísticamente significativo- en los hepatocitos transfectados con AdUCP2 ($0,88 \pm 0,2$).

La caída en la concentración celular de ATP y en el aumento de los niveles de AMP en los hepatocitos transfectados con AdUCP2 está en concordancia con lo anteriormente observado en los estudios con ratones transgénicos que sobreexpresan hUCP2 en el hígado, así como con lo reportado por Shan et al (2009) y González-Muniesa et al (2005 y 2006), como ya se ha comentado.

Estos resultados parecen indicar que el marcado efecto desacoplante observado en mitocondrias aisladas de hepatocitos cultivados que expresan hUCP2 parece ser en parte artefactual, y por tanto no inhibible por GDP, y podría deberse a una

“excesiva” sobreexpresión de hUCP2 en la membrana interna mitocondrial de los hepatocitos cultivados transfectados con AdUCP2. Esta sobreexpresión alteraría la estructura de la membrana interna mitocondrial alterando el acoplamiento entre respiración y fosforilación oxidativa, con la consiguiente alteración del gradiente quimiosmótico y pérdida del control respiratorio por ADP. Sin embargo, la marcada alteración del funcionamiento de las mitocondrias aisladas sólo se correlaciona con una moderada caída (26%) del contenido de ATP en los hepatocitos que expresan hUCP2, en relación con los hepatocitos transfectados con Ad β gal. En este sentido, es posible también, que el aislamiento de las mitocondrias de los hepatocitos en cultivo pueda también contribuir a alterar el funcionamiento mitocondrial de un modo más agresivo que cuando se obtienen de los hígados de los ratones.

Cuando estudiamos como la sobreexpresión de hUCP2 afecta al metabolismo de la glucosa en los hepatocitos en cultivo, observamos que en relación con los hepatocitos controles transfectados con Ad β gal, se producía un aumento muy significativo del metabolismo oxidativo de la glucosa (glucólisis aerobia) y de su conversión en CO₂ (aumento del 79%), lo cual parece estar de acuerdo con el incremento de la respiración celular por el efecto desacoplante de hUCP2. Resultados similares fueron obtenidos por Wang et al (1999) que observaron un marcado aumento de la oxidación de [3H] glucosa en islotes de rata ZDF transfectados con el gen UCP2. Del mismo modo, miocitos humanos cultivados que sobreexpresan UCP3 mostraron un aumento de la oxidación de glucosa, del flujo glucolítico y de la captación de 2-deoxiglucosa (Garcia-Martinez et al. 2001).

En coherencia con lo anterior, la formación de L-lactato (producto final de la glucólisis anaerobia) está marcadamente disminuida (un 34%). Sin embargo, y como cabía esperar la conversión de glucosa en glucógeno (metabolismo biosintético no oxidativo) no mostró diferencias estadísticamente significativas entre los hepatocitos transfectados con AdUCP2 y con Ad β gal.

Cuando examinamos la influencia que la sobreexpresión de hUCP2 en hepatocitos cultivados tenía sobre la capacidad gluconeogénica de estas células, observamos como la conversión de [¹⁴C]lactato/piruvato en [¹⁴C]glucosa estaba marcadamente disminuida (un 72 %), en relación con la observada en hepatocitos transfectados con Ad β gal. Este efecto inhibidor de la gluconeogénesis hepática guarda una estrecha coherencia con la estimulación de la glucólisis aerobia que los

hepatocitos transfectados con hUCP2 muestran, ya que en el hígado son vías metabólicas que se modulan de manera recíproca (Pilkis and Claus 1991).

De esta forma, un aumento del metabolismo oxidativo de la glucosa en el hígado y una disminución del flujo gluconeogénico hepático podría explicar –al menos en parte- la resistencia a la aparición de intolerancia a la glucosa y la mejora de la resistencia a la insulina, que la sobreexpresión de hUCP2 en el hígado de los ratones transgénicos provoca cuando se someten a una dieta alta en lípidos.

CONCLUSIONES

6 CONCLUSIONES

- Se han obtenido ratones transgénicos que sobreexpresan el gen hUCP2 en hígado. El aumento de la expresión hepática de hUCP2 se correlaciona con niveles elevados de mRNA de hUCP2 y con una sobreexpresión de la proteína hUCP2 en mitocondrias aisladas de hígado.
- La sobreexpresión del gen hUCP2 tiene un efecto desacoplante sobre la fosforilación oxidativa en hígado, ya que en mitocondrias aisladas de hígado de ratones transgénicos se produce un aumento significativo del consumo de O₂ y una marcada disminución del potencial de membrana respecto a lo observado en mitocondrias de ratones controles. El hecho de que el efecto desacoplante se revierta totalmente con GDP (inhibidor alostérico específico de la actividad desacoplante de la UCP2) claramente indica el efecto desacoplante observado no es debido a una alteración topológica de la membrana interna mitocondrial, sino a la propia función específica desacoplante de la hUCP2.
- La alteración del metabolismo energético mitocondrial por la sobreexpresión de hUCP2 se acompaña de una importante caída del contenido hepático de ATP y de la carga energética, y de un aumento de los niveles de AMP en el hígado de los animales transgénicos ayunados 24 o 48 horas.
- Cuando los animales transgénicos se alimentaron con una dieta alta en lípidos, se observó una menor intolerancia a la glucosa y una menor resistencia a la insulina, disminuyendo los niveles plasmáticos de glucosa e insulina y mejorando las curvas de tolerancia a la glucosa e insulina.
- Los hepatocitos de rata en cultivo primario infectados con adenovirus portadores del gen hUCP2 (AdUCP2) efectivamente expresan el gen hUCP2 tanto a nivel de mRNA como de proteína, no detectándose expresión en hepatocitos no infectados o infectados con adenovirus portadores del gen β gal (Ad β gal).
- Las mitocondrias aisladas de hepatocitos infectados con AdUCP2 muestran un desacoplamiento importante de la fosforilación oxidativa, que se manifiesta en un aumento significativo del consumo de O₂ y una disminución del potencial de

membrana mitocondrial. También disminuyen los niveles celulares de ATP, pero no se modifican las concentraciones de ADP y AMP ni la carga energética. Hay que mencionar que el marcado efecto desacoplante observado en mitocondrias aisladas de hepatocitos cultivados que expresan hUCP2 parece ser en parte artefactual, y por tanto no inhibible por GDP, y podría deberse a una “excesiva” sobreexpresión de hUCP2 en la membrana interna mitocondrial de los hepatocitos cultivados transfectados con AdUCP2.

- La expresión de hUCP2 en hepatocitos cultivados estimula el metabolismo oxidativo de la glucosa, de manera que aumenta la conversión de glucosa en CO₂, disminuye la formación de lactato y no se modifica la conversión de glucosa en glucógeno.
- La expresión de hUCP2 en hepatocitos cultivados produce una significativa disminución en la producción de glucosa a partir de lactato/piruvato en relación a lo observado en hepatocitos control.

BIBLIOGRAFÍA

7 BIBLIOGRAFÍA

- Adam H, d. V. (1965). Adenosine-5'-diphosphate and adenosine-5'-monophosphate, in Methods of Enzymatic Analysis. New York, Academic Press.
- Adams, A. E., A. M. Carroll, et al. (2008). "Mitochondrial uncoupling protein 1 expression in thymocytes." Biochim Biophys Acta **1777**(7-8): 772-6.
- Adams, A. E., O. Hanrahan, et al. (2008). "Images of mitochondrial UCP 1 in mouse thymocytes using confocal microscopy." Biochim Biophys Acta **1777**(2): 115-7.
- Affourtit, C. and M. D. Brand (2008). "Uncoupling protein-2 contributes significantly to high mitochondrial proton leak in INS-1E insulinoma cells and attenuates glucose-stimulated insulin secretion." Biochem J **409**(1): 199-204.
- Alan, L., K. Smolkova, et al. (2009). "Absolute levels of transcripts for mitochondrial uncoupling proteins UCP2, UCP3, UCP4, and UCP5 show different patterns in rat and mice tissues." J Bioenerg Biomembr **41**(1): 71-8.
- Almeida, A. M., W. Jarmuszkiewicz, et al. (1999). "Cyanide-resistant, ATP-synthesis-sustained, and uncoupling-protein-sustained respiration during postharvest ripening of tomato fruit." Plant Physiol **119**(4): 1323-30.
- Almeida, A. M., R. Navet, et al. (2002). "The energy-conserving and energy-dissipating processes in mitochondria isolated from wild type and nonripening tomato fruits during development on the plant." J Bioenerg Biomembr **34**(6): 487-98.
- Alonso, A., A. Marti, et al. (2005). "Association of UCP3 gene -55C>T polymorphism and obesity in a Spanish population." Ann Nutr Metab **49**(3): 183-8.
- Aquila, H., T. A. Link, et al. (1985). "The uncoupling protein from brown fat mitochondria is related to the mitochondrial ADP/ATP carrier. Analysis of sequence homologies and of folding of the protein in the membrane." Embo J **4**(9): 2369-76.
- Argyropoulos, G., A. M. Brown, et al. (1998). "Effects of mutations in the human uncoupling protein 3 gene on the respiratory quotient and fat oxidation in severe obesity and type 2 diabetes." J Clin Invest **102**(7): 1345-51.
- Arsenijevic, D., H. Onuma, et al. (2000). "Disruption of the uncoupling protein-2 gene in mice reveals a role in immunity and reactive oxygen species production." Nat Genet **26**(4): 435-9.
- Bao, S., A. Kennedy, et al. (1998). "Expression of mRNAs encoding uncoupling proteins in human skeletal muscle: effects of obesity and diabetes." Diabetes **47**(12): 1935-40.
- Barbe, P., L. Millet, et al. (1998). "Uncoupling protein-2 messenger ribonucleic acid expression during very-low-calorie diet in obese premenopausal women." J Clin Endocrinol Metab **83**(7): 2450-3.
- Berentzen, T., L. T. Dalgaard, et al. (2005). "Interactions between physical activity and variants of the genes encoding uncoupling proteins -2 and -3 in relation to body weight changes during a 10-y follow-up." Int J Obes (Lond) **29**(1): 93-9.
- Bezaire, V., W. Hofmann, et al. (2001). "Effects of fasting on muscle mitochondrial energetics and fatty acid metabolism in Ucp3(-/-) and wild-type mice." Am J Physiol Endocrinol Metab **281**(5): E975-82.
- Bezaire, V., L. L. Spriet, et al. (2005). "Constitutive UCP3 overexpression at physiological levels increases mouse skeletal muscle capacity for fatty acid transport and oxidation." Faseb J **19**(8): 977-9.
- Bosch, F., A. Pujol, et al. (1998). "Transgenic mice in the analysis of metabolic regulation." Annu Rev Nutr **18**: 207-32.
- Boss, O., T. Hagen, et al. (2000). "Uncoupling proteins 2 and 3: potential regulators of mitochondrial energy metabolism." Diabetes **49**(2): 143-56.

- Boss, O., P. Muzzin, et al. (1998). "The uncoupling proteins, a review." Eur J Endocrinol **139**(1): 1-9.
- Boss, O., S. Samec, et al. (1997). "Tissue-dependent upregulation of rat uncoupling protein-2 expression in response to fasting or cold." FEBS Lett **412**(1): 111-4.
- Boss, O., S. Samec, et al. (1997). "Uncoupling protein-3: a new member of the mitochondrial carrier family with tissue-specific expression." FEBS Lett **408**(1): 39-42.
- Bouchard, C., L. Perusse, et al. (1997). "Linkage between markers in the vicinity of the uncoupling protein 2 gene and resting metabolic rate in humans." Hum Mol Genet **6**(11): 1887-9.
- Bouillaud, F., I. Arechaga, et al. (1994). "A sequence related to a DNA recognition element is essential for the inhibition by nucleotides of proton transport through the mitochondrial uncoupling protein." Embo J **13**(8): 1990-7.
- Bouillaud, F., D. Ricquier, et al. (1985). "Molecular approach to thermogenesis in brown adipose tissue: cDNA cloning of the mitochondrial uncoupling protein." Proc Natl Acad Sci U S A **82**(2): 445-8.
- Boyer, B. B. and L. P. Kozak (1991). "The mitochondrial uncoupling protein gene in brown fat: correlation between DNase I hypersensitivity and expression in transgenic mice." Mol Cell Biol **11**(8): 4147-56.
- Boyer, P. D. (1997). "The ATP synthase--a splendid molecular machine." Annu Rev Biochem **66**: 717-49.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem **72**: 248-54.
- Brand, M. D., L. F. Chien, et al. (1994). "Experimental discrimination between proton leak and redox slip during mitochondrial electron transport." Biochem J **297** (Pt 1): 27-9.
- Brandalise, M., I. G. Maia, et al. (2003). "Overexpression of plant uncoupling mitochondrial protein in transgenic tobacco increases tolerance to oxidative stress." J Bioenerg Biomembr **35**(3): 203-9.
- Brown, G. C. (1992). "The leaks and slips of bioenergetic membranes." Faseb J **6**(11): 2961-5.
- Buettner, R., J. Scholmerich, et al. (2007). "High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents." Obesity (Silver Spring) **15**(4): 798-808.
- Busquets, S., D. Sanchis, et al. (1998). "In the rat, tumor necrosis factor alpha administration results in an increase in both UCP2 and UCP3 mRNAs in skeletal muscle: a possible mechanism for cytokine-induced thermogenesis?" FEBS Lett **440**(3): 348-50.
- Cadenas, S., J. A. Buckingham, et al. (1999). "UCP2 and UCP3 rise in starved rat skeletal muscle but mitochondrial proton conductance is unchanged." FEBS Lett **462**(3): 257-60.
- Cadenas, S., K. S. Echtay, et al. (2002). "The basal proton conductance of skeletal muscle mitochondria from transgenic mice overexpressing or lacking uncoupling protein-3." J Biol Chem **277**(4): 2773-8.
- Calegario, F. F., R. G. Cosso, et al. (2003). "Stimulation of potato tuber respiration by cold stress is associated with an increased capacity of both plant uncoupling mitochondrial protein (PUMP) and alternative oxidase." J Bioenerg Biomembr **35**(3): 211-20.
- Carmona, M. C., A. Valmaseda, et al. (1998). "Differential regulation of uncoupling protein-2 and uncoupling protein-3 gene expression in brown adipose tissue during development and cold exposure." Biochem Biophys Res Commun **243**(1): 224-8.

- Carroll, A. M., L. R. Haines, et al. (2005). "Identification of a functioning mitochondrial uncoupling protein 1 in thymus." *J Biol Chem* **280**(16): 15534-43.
- Cassard-Doulcier, A. M., C. Gelly, et al. (1998). "A 211-bp enhancer of the rat uncoupling protein-1 (UCP-1) gene controls specific and regulated expression in brown adipose tissue." *Biochem J* **333** (Pt 2): 243-6.
- Cassard-Doulcier, A. M., C. Gelly, et al. (1993). "Tissue-specific and beta-adrenergic regulation of the mitochondrial uncoupling protein gene: control by cis-acting elements in the 5'-flanking region." *Mol Endocrinol* **7**(4): 497-506.
- Cassard-Doulcier, A. M., M. Larose, et al. (1994). "In vitro interactions between nuclear proteins and uncoupling protein gene promoter reveal several putative transactivating factors including Ets1, retinoid X receptor, thyroid hormone receptor, and a CACCC box-binding protein." *J Biol Chem* **269**(39): 24335-42.
- Cassard, A. M., F. Bouillaud, et al. (1990). "Human uncoupling protein gene: structure, comparison with rat gene, and assignment to the long arm of chromosome 4." *J Cell Biochem* **43**(3): 255-64.
- Cassell, P. G., P. J. Saker, et al. (2000). "Evidence that single nucleotide polymorphism in the uncoupling protein 3 (UCP3) gene influences fat distribution in women of European and Asian origin." *Diabetologia* **43**(12): 1558-64.
- Clapham, J. C., J. R. Arch, et al. (2000). "Mice overexpressing human uncoupling protein-3 in skeletal muscle are hyperphagic and lean." *Nature* **406**(6794): 415-8.
- Considine, M. J., D. O. Daley, et al. (2001). "The expression of alternative oxidase and uncoupling protein during fruit ripening in mango." *Plant Physiol* **126**(4): 1619-29.
- Cortez-Pinto, H., S. Q. Yang, et al. (1998). "Bacterial lipopolysaccharide induces uncoupling protein-2 expression in hepatocytes by a tumor necrosis factor-alpha-dependent mechanism." *Biochem Biophys Res Commun* **251**(1): 313-9.
- Cortez-Pinto, H., H. Zhi Lin, et al. (1999). "Lipids up-regulate uncoupling protein 2 expression in rat hepatocytes." *Gastroenterology* **116**(5): 1184-93.
- Cortright, R. N., D. Zheng, et al. (1999). "Regulation of skeletal muscle UCP-2 and UCP-3 gene expression by exercise and denervation." *Am J Physiol* **276**(1 Pt 1): E217-21.
- Costa, A. D., I. L. Nantes, et al. (1999). "Plant uncoupling mitochondrial protein activity in mitochondria isolated from tomatoes at different stages of ripening." *J Bioenerg Biomembr* **31**(5): 527-33.
- Costford, S. R., S. N. Chaudhry, et al. (2006). "Effects of the presence, absence, and overexpression of uncoupling protein-3 on adiposity and fuel metabolism in congenic mice." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **290**(6): E1304-12.
- Couplan, E., M. del Mar Gonzalez-Barroso, et al. (2002). "No evidence for a basal, retinoic, or superoxide-induced uncoupling activity of the uncoupling protein 2 present in spleen or lung mitochondria." *J Biol Chem* **277**(29): 26268-75.
- Couplan, E., C. Gelly, et al. (2002). "High level of uncoupling protein 1 expression in muscle of transgenic mice selectively affects muscles at rest and decreases their IIb fiber content." *J Biol Chem* **277**(45): 43079-88.
- Crowley, V. and A. J. Vidal-Puig (2001). "Mitochondrial uncoupling proteins (UCPs) and obesity." *Nutr Metab Cardiovasc Dis* **11**(1): 70-5.
- Chan, C. B., D. De Leo, et al. (2001). "Increased uncoupling protein-2 levels in beta-cells are associated with impaired glucose-stimulated insulin secretion: mechanism of action." *Diabetes* **50**(6): 1302-10.
- Chan, C. B., P. E. MacDonald, et al. (1999). "Overexpression of uncoupling protein 2 inhibits glucose-stimulated insulin secretion from rat islets." *Diabetes* **48**(7): 1482-6.

- Chan, C. B., M. C. Saleh, et al. (2004). "Uncoupling protein 2 and islet function." Diabetes **53 Suppl 1**: S136-42.
- Chavin, K. D., S. Yang, et al. (1999). "Obesity induces expression of uncoupling protein-2 in hepatocytes and promotes liver ATP depletion." J Biol Chem **274**(9): 5692-700.
- Chen, H. H., W. J. Lee, et al. (2007). "Ala55Val polymorphism on UCP2 gene predicts greater weight loss in morbidly obese patients undergoing gastric banding." Obes Surg **17**(7): 926-33.
- Chomczynski, P. and N. Sacchi (1987). "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction." Anal Biochem **162**(1): 156-9.
- Chung, W. K., A. Luke, et al. (1999). "Genetic and physiologic analysis of the role of uncoupling protein 3 in human energy homeostasis." Diabetes **48**(9): 1890-5.
- Dalgaard, L. T., T. I. Sorensen, et al. (2001). "A prevalent polymorphism in the promoter of the UCP3 gene and its relationship to body mass index and long term body weight change in the Danish population." J Clin Endocrinol Metab **86**(3): 1398-402.
- Del Mar Gonzalez-Barroso, M., D. Ricquier, et al. (2000). "The human uncoupling protein-1 gene (UCP1): present status and perspectives in obesity research." Obes Rev **1**(2): 61-72.
- Dimroth, P., G. Kaim, et al. (2000). "Crucial role of the membrane potential for ATP synthesis by F(1)F(o) ATP synthases." J Exp Biol **203**(Pt 1): 51-9.
- Echtay, K. S. (2007). "Mitochondrial uncoupling proteins--what is their physiological role?" Free Radic Biol Med **43**(10): 1351-71.
- Echtay, K. S., D. Roussel, et al. (2002). "Superoxide activates mitochondrial uncoupling proteins." Nature **415**(6867): 96-9.
- Echtay, K. S., E. Winkler, et al. (2001). "Uncoupling proteins 2 and 3 are highly active H(+) transporters and highly nucleotide sensitive when activated by coenzyme Q (ubiquinone)." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(4): 1416-21.
- Enerback, S., A. Jacobsson, et al. (1997). "Mice lacking mitochondrial uncoupling protein are cold-sensitive but not obese." Nature **387**(6628): 90-4.
- Esterbauer, H., C. Schneitler, et al. (2001). "A common polymorphism in the promoter of UCP2 is associated with decreased risk of obesity in middle-aged humans." Nat Genet **28**(2): 178-83.
- Feldmann, H. M., V. Golozoubova, et al. (2009). "UCP1 ablation induces obesity and abolishes diet-induced thermogenesis in mice exempt from thermal stress by living at thermoneutrality." Cell Metab **9**(2): 203-9.
- Felipe, F., M. L. Bonet, et al. (2003). "Up-regulation of muscle uncoupling protein 3 gene expression in mice following high fat diet, dietary vitamin A supplementation and acute retinoic acid-treatment." Int J Obes Relat Metab Disord **27**(1): 60-9.
- Fillingame, R. H., W. Jiang, et al. (2000). "Coupling H(+) transport to rotary catalysis in F-type ATP synthases: structure and organization of the transmembrane rotary motor." J Exp Biol **203**(Pt 1): 9-17.
- Fleury, C., M. Neverova, et al. (1997). "Uncoupling protein-2: a novel gene linked to obesity and hyperinsulinemia." Nat Genet **15**(3): 269-72.
- Fleury, C. and D. Sanchis (1999). "The mitochondrial uncoupling protein-2: current status." Int J Biochem Cell Biol **31**(11): 1261-78.
- Fritz, T., D. K. Kramer, et al. (2006). "Low-intensity exercise increases skeletal muscle protein expression of PPARdelta and UCP3 in type 2 diabetic patients." Diabetes Metab Res Rev.

- Fukuda, H., T. Hirakawa, et al. (2007). "Nutritional and hormonal regulation of uncoupling protein gene expression in rat adipocytes." J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo) **53**(5): 426-31.
- Gagnon, J., F. Lago, et al. (1998). "DNA polymorphism in the uncoupling protein 1 (UCP1) gene has no effect on obesity related phenotypes in the Swedish Obese Subjects cohorts." Int J Obes Relat Metab Disord **22**(6): 500-5.
- Gao, C. L., J. G. Zhu, et al. "Mitochondrial dysfunction is induced by the overexpression of UCP4 in 3T3-L1 adipocytes." Int J Mol Med **25**(1): 71-80.
- Garcia-Martinez, C., B. Sibille, et al. (2001). "Overexpression of UCP3 in cultured human muscle lowers mitochondrial membrane potential, raises ATP/ADP ratio, and favors fatty acid vs. glucose oxidation." Faseb J **15**(11): 2033-5.
- Garlid, K. D., M. Jaburek, et al. (1998). "The mechanism of proton transport mediated by mitochondrial uncoupling proteins." FEBS Lett **438**(1-2): 10-4.
- Gimeno, R. E., M. Dembski, et al. (1997). "Cloning and characterization of an uncoupling protein homolog: a potential molecular mediator of human thermogenesis." Diabetes **46**(5): 900-6.
- Goglia, F. and V. P. Skulachev (2003). "A function for novel uncoupling proteins: antioxidant defense of mitochondrial matrix by translocating fatty acid peroxides from the inner to the outer membrane leaflet." Faseb J **17**(12): 1585-91.
- Gong, D. W., Y. He, et al. (1997). "Uncoupling protein-3 is a mediator of thermogenesis regulated by thyroid hormone, beta3-adrenergic agonists, and leptin." J Biol Chem **272**(39): 24129-32.
- Gong, D. W., Y. He, et al. (1999). "Genomic organization and regulation by dietary fat of the uncoupling protein 3 and 2 genes." Biochem Biophys Res Commun **256**(1): 27-32.
- Gong, D. W., S. Monemdjou, et al. (2000). "Lack of obesity and normal response to fasting and thyroid hormone in mice lacking uncoupling protein-3." J Biol Chem **275**(21): 16251-7.
- Gonzalez-Muniesa, P., F. I. Milagro, et al. (2005). "Ectopic UCP1 gene expression in HepG2 cells affects ATP production." J Physiol Biochem **61**(2): 389-93.
- Gonzalez-Muniesa, P., F. I. Milagro, et al. (2006). "Reduction in energy efficiency induced by expression of the uncoupling protein, UCP1, in mouse liver mitochondria." Int J Mol Med **17**(4): 591-7.
- Guerini, D., E. Prati, et al. (2002). "Uncoupling of protein-3 induces an uncontrolled uncoupling of mitochondria after expression in muscle derived L6 cells." Eur J Biochem **269**(5): 1373-81.
- Guerre-Millo, M., C. Rouault, et al. (2001). "PPAR-alpha-null mice are protected from high-fat diet-induced insulin resistance." Diabetes **50**(12): 2809-14.
- Hagen, T., C. Y. Zhang, et al. (1999). "Assessment of uncoupling activity of the human uncoupling protein 3 short form and three mutants of the uncoupling protein gene using a yeast heterologous expression system." FEBS Lett **454**(3): 201-6.
- Halsall, D. J., J. Luan, et al. (2001). "Uncoupling protein 3 genetic variants in human obesity: the c-55t promoter polymorphism is negatively correlated with body mass index in a UK Caucasian population." Int J Obes Relat Metab Disord **25**(4): 472-7.
- Harper, J. A., J. A. Stuart, et al. (2002). "Artifactual uncoupling by uncoupling protein 3 in yeast mitochondria at the concentrations found in mouse and rat skeletal-muscle mitochondria." Biochem J **361**(Pt 1): 49-56.
- Hayakawa, T., Y. Nagai, et al. (1999). "Phenotypic characterization of the beta3-adrenergic receptor mutation and the uncoupling protein 1 polymorphism in Japanese men." Metabolism **48**(5): 636-40.

- Heidkaemper, D., E. Winkler, et al. (2000). "The bulk of UCP3 expressed in yeast cells is incompetent for a nucleotide regulated H⁺ transport." FEBS Lett **480**(2-3): 265-70.
- Heilbronn, L. K., K. L. Kind, et al. (2000). "Association of -3826 G variant in uncoupling protein-1 with increased BMI in overweight Australian women." Diabetologia **43**(2): 242-4.
- Herrmann, S. M., J. G. Wang, et al. (2003). "Uncoupling protein 1 and 3 polymorphisms are associated with waist-to-hip ratio." J Mol Med **81**(5): 327-32.
- Hidaka, S., T. Kakuma, et al. (1999). "Streptozotocin treatment upregulates uncoupling protein 3 expression in the rat heart." Diabetes **48**(2): 430-5.
- Himms-Hagen, J. and M. E. Harper (2001). "Physiological role of UCP3 may be export of fatty acids from mitochondria when fatty acid oxidation predominates: an hypothesis." Exp Biol Med (Maywood) **226**(2): 78-84.
- Hinz, W., B. Faller, et al. (1999). "Recombinant human uncoupling protein-3 increases thermogenesis in yeast cells." FEBS Lett **448**(1): 57-61.
- Hohorst, H. J. (1965). L(+)-lactate determination with lactic dehydrogenase and DNP, in Methods of Enzymatic Analysis. New York, Academic Press.
- Hong, Y., B. D. Fink, et al. (2001). "Effects of adenoviral overexpression of uncoupling protein-2 and -3 on mitochondrial respiration in insulinoma cells." Endocrinology **142**(1): 249-56.
- Hourton-Cabassa, C., A. Mesneau, et al. (2002). "Alteration of plant mitochondrial proton conductance by free fatty acids. Uncoupling protein involvement." J Biol Chem **277**(44): 41533-8.
- Hue, L., F. Bontemps, et al. (1975). "The effects of glucose and of potassium ions on the interconversion of the two forms of glycogen phosphorylase and of glycogen synthetase in isolated rat liver preparations." Biochem J **152**(1): 105-14.
- Hurtaud, C., C. Gelly, et al. (2006). "Translation control of UCP2 synthesis by the upstream open reading frame." Cell Mol Life Sci **63**(15): 1780-9.
- Ishigaki, Y., H. Katagiri, et al. (2005). "Dissipating excess energy stored in the liver is a potential treatment strategy for diabetes associated with obesity." Diabetes **54**(2): 322-32.
- Ito, K., K. Matsukawa, et al. (2006). "Functional analysis of skunk cabbage SfUCPB, a unique uncoupling protein lacking the fifth transmembrane domain, in yeast cells." Biochem Biophys Res Commun **349**(1): 383-90.
- Jaburek, M. and K. D. Garlid (2003). "Reconstitution of recombinant uncoupling proteins: UCP1, -2, and -3 have similar affinities for ATP and are unaffected by coenzyme Q10." J Biol Chem **278**(28): 25825-31.
- Jaburek, M., M. Varecha, et al. (1999). "Transport function and regulation of mitochondrial uncoupling proteins 2 and 3." J Biol Chem **274**(37): 26003-7.
- Jacobsson, A., U. Stadler, et al. (1985). "Mitochondrial uncoupling protein from mouse brown fat. Molecular cloning, genetic mapping, and mRNA expression." J Biol Chem **260**(30): 16250-4.
- Jarmuszkiewicz, W., G. Milani, et al. (2000). "First evidence and characterization of an uncoupling protein in fungi kingdom: CpUCP of *Candida parapsilosis*." FEBS Lett **467**(2-3): 145-9.
- Jarmuszkiewicz, W., C. M. Sluse-Goffart, et al. (1999). "Identification and characterization of a protozoan uncoupling protein in *Acanthamoeba castellanii*." J Biol Chem **274**(33): 23198-202.
- Jastroch, M., A. S. Divakaruni, et al. "Mitochondrial proton and electron leaks." Essays Biochem **47**: 53-67.
- Jastroch, M., K. Withers, et al. (2004). "Uncoupling protein 2 and 3 in marsupials: identification, phylogeny, and gene expression in response to cold and fasting in *Antechinus flavipes*." Physiol Genomics **17**(2): 130-9.

- Jezek, P., A. D. Costa, et al. (1996). "Evidence for anion-translocating plant uncoupling mitochondrial protein in potato mitochondria." *J Biol Chem* **271**(51): 32743-8.
- Jezek, P., A. D. Costa, et al. (1997). "Reconstituted plant uncoupling mitochondrial protein allows for proton translocation via fatty acid cycling mechanism." *J Biol Chem* **272**(39): 24272-8.
- Jezek, P., H. Engstova, et al. (1998). "Fatty acid cycling mechanism and mitochondrial uncoupling proteins." *Biochim Biophys Acta* **1365**(1-2): 319-27.
- Jezek, P., D. E. Orosz, et al. (1990). "Reconstitution of the uncoupling protein of brown adipose tissue mitochondria. Demonstration of GDP-sensitive halide anion uniport." *J Biol Chem* **265**(31): 19296-302.
- Jezek, P., M. Zackova, et al. (2000). "Occurrence of Plant-Uncoupling Mitochondrial Protein (PUMP) in Diverse Organs and Tissues of Several Plants." *J Bioenerg Biomembr* **32**(6): 549-61.
- Jia, J. J., X. Zhang, et al. (2009). "The polymorphisms of UCP2 and UCP3 genes associated with fat metabolism, obesity and diabetes." *Obes Rev* **10**(5): 519-26.
- Jiang, N., G. Zhang, et al. (2009). "Upregulation of uncoupling protein-3 in skeletal muscle during exercise: a potential antioxidant function." *Free Radic Biol Med* **46**(2): 138-45.
- Joseph, J. W., V. Koshkin, et al. (2002). "Uncoupling protein 2 knockout mice have enhanced insulin secretory capacity after a high-fat diet." *Diabetes* **51**(11): 3211-9.
- Kageyama, H., A. Suga, et al. (1998). "Increased uncoupling protein-2 and -3 gene expressions in skeletal muscle of STZ-induced diabetic rats." *FEBS Lett* **440**(3): 450-3.
- Kaisaki, P. J., P. Y. Woon, et al. (1998). "Localization of tub and uncoupling proteins (Ucp) 2 and 3 to a region of rat chromosome 1 linked to glucose intolerance and adiposity in the Goto-Kakizaki (GK) type 2 diabetic rat." *Mamm Genome* **9**(11): 910-2.
- Kim-Han, J. S., S. A. Reichert, et al. (2001). "BMCP1: a mitochondrial uncoupling protein in neurons which regulates mitochondrial function and oxidant production." *J Neurochem* **79**(3): 658-68.
- Klingenberg, M. (2008). "The ADP and ATP transport in mitochondria and its carrier." *Biochim Biophys Acta* **1778**(10): 1978-2021.
- Klingenberg, M. and K. S. Echtay (2001). "Uncoupling proteins: the issues from a biochemist point of view." *Biochim Biophys Acta* **1504**(1): 128-43.
- Klingenberg, M. and S. G. Huang (1999). "Structure and function of the uncoupling protein from brown adipose tissue." *Biochim Biophys Acta* **1415**(2): 271-96.
- Klingenberg, M. and E. Winkler (1985). "The reconstituted isolated uncoupling protein is a membrane potential driven H⁺ translocator." *Embo J* **4**(12): 3087-92.
- Kontani, Y., Y. Wang, et al. (2005). "UCP1 deficiency increases susceptibility to diet-induced obesity with age." *Aging Cell* **4**(3): 147-55.
- Kopecky, J., G. Clarke, et al. (1995). "Expression of the mitochondrial uncoupling protein gene from the aP2 gene promoter prevents genetic obesity." *J Clin Invest* **96**(6): 2914-23.
- Kopecky, J., Z. Hodny, et al. (1996). "Reduction of dietary obesity in aP2-Ucp transgenic mice: physiology and adipose tissue distribution." *Am J Physiol* **270**(5 Pt 1): E768-75.
- Kovacs, P., L. Ma, et al. (2005). "Genetic variation in UCP2 (uncoupling protein-2) is associated with energy metabolism in Pima Indians." *Diabetologia* **48**(11): 2292-5.
- Kozak, L. P. and M. E. Harper (2000). "Mitochondrial uncoupling proteins in energy expenditure." *Annu Rev Nutr* **20**: 339-63.

- Kozak, L. P. and R. A. Koza (1999). "Mitochondria uncoupling proteins and obesity: molecular and genetic aspects of UCP1." Int J Obes Relat Metab Disord **23 Suppl 6**: S33-7.
- Kozak, U. C., J. Kopecky, et al. (1994). "An upstream enhancer regulating brown-fat-specific expression of the mitochondrial uncoupling protein gene." Mol Cell Biol **14**(1): 59-67.
- Krauss, S., C. Y. Zhang, et al. (2002). "A significant portion of mitochondrial proton leak in intact thymocytes depends on expression of UCP2." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(1): 118-22.
- Krauss, S., C. Y. Zhang, et al. (2005). "The mitochondrial uncoupling-protein homologues." Nat Rev Mol Cell Biol **6**(3): 248-61.
- Krebs, H. A., Cornell, N. W., Lund, P., and Hems, R (1974). Isolated liver cells as experimental material, in Regulation of Hepatic Metabolism. Munksgaard, Copenhagen.
- Krook, A., J. Digby, et al. (1998). "Uncoupling protein 3 is reduced in skeletal muscle of NIDDM patients." Diabetes **47**(9): 1528-31.
- Laird, P. W., A. Zijderveld, et al. (1991). "Simplified mammalian DNA isolation procedure." Nucleic Acids Res **19**(15): 4293.
- Lamprecht W, T. I. (1974). ATP determination with hexokinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase, in Methods of Enzymatic Analysis. New York, Academic Press.
- Lanni, A., M. Moreno, et al. (2003). "Thyroid hormone and uncoupling proteins." FEBS Lett **543**(1-3): 5-10.
- Lanouette, C. M., Y. C. Chagnon, et al. (2002). "Uncoupling protein 3 gene is associated with body composition changes with training in HERITAGE study." J Appl Physiol **92**(3): 1111-8.
- Larose, M., A. M. Cassard-Doulcier, et al. (1996). "Essential cis-acting elements in rat uncoupling protein gene are in an enhancer containing a complex retinoic acid response domain." J Biol Chem **271**(49): 31533-42.
- Larrouy, D., P. Laharrague, et al. (1997). "Kupffer cells are a dominant site of uncoupling protein 2 expression in rat liver." Biochem Biophys Res Commun **235**(3): 760-4.
- Ledesma, A., M. G. de Lacoba, et al. (2002). "The mitochondrial uncoupling proteins." Genome Biol **3**(12): REVIEWS3015.
- Lee, F. Y., Y. Li, et al. (1999). "Tumor necrosis factor increases mitochondrial oxidant production and induces expression of uncoupling protein-2 in the regenerating mice [correction of rat] liver." Hepatology **29**(3): 677-87.
- Lee, Y. H., W. Kim, et al. (2008). "Association of the ins/del polymorphisms of uncoupling protein 2 (UCP2) with BMI in a Korean population." Biochem Biophys Res Commun **371**(4): 767-71.
- Li, B., L. A. Nolte, et al. (2000). "Skeletal muscle respiratory uncoupling prevents diet-induced obesity and insulin resistance in mice." Nat Med **6**(10): 1115-20.
- Lin, C. S. and M. Klingenberg (1980). "Isolation of the uncoupling protein from brown adipose tissue mitochondria." FEBS Lett **113**(2): 299-303.
- Liu, D., S. L. Chan, et al. (2006). "Mitochondrial UCP4 mediates an adaptive shift in energy metabolism and increases the resistance of neurons to metabolic and oxidative stress." Neuromolecular Med **8**(3): 389-414.
- Liu, Y. J., P. Y. Liu, et al. (2005). "Linkage and association analyses of the UCP3 gene with obesity phenotypes in Caucasian families." Physiol Genomics **22**(2): 197-203.
- Lowell, B. B., S. S. V, et al. (1993). "Development of obesity in transgenic mice after genetic ablation of brown adipose tissue." Nature **366**(6457): 740-2.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, et al. (1951). "Protein measurement with the Folin phenol reagent." J Biol Chem **193**(1): 265-75.

- MacLellan, J. D., M. F. Gerrits, et al. (2005). "Physiological increases in uncoupling protein 3 augment fatty acid oxidation and decrease reactive oxygen species production without uncoupling respiration in muscle cells." *Diabetes* **54**(8): 2343-50.
- Mao, W., X. X. Yu, et al. (1999). "UCP4, a novel brain-specific mitochondrial protein that reduces membrane potential in mammalian cells." *FEBS Lett* **443**(3): 326-30.
- Masaki, T., H. Yoshimatsu, et al. (2000). "Impaired response of UCP family to cold exposure in diabetic (db/db) mice." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **279**(4): R1305-9.
- Matsuda, J., K. Hosoda, et al. (1997). "Cloning of rat uncoupling protein-3 and uncoupling protein-2 cDNAs: their gene expression in rats fed high-fat diet." *FEBS Lett* **418**(1-2): 200-4.
- Mattiasson, G. and P. G. Sullivan (2006). "The emerging functions of UCP2 in health, disease, and therapeutics." *Antioxid Redox Signal* **8**(1-2): 1-38.
- McGrane, M. M., J. de Vente, et al. (1988). "Tissue-specific expression and dietary regulation of a chimeric phosphoenolpyruvate carboxykinase/bovine growth hormone gene in transgenic mice." *J Biol Chem* **263**(23): 11443-51.
- Millet, L., H. Vidal, et al. (1997). "Increased uncoupling protein-2 and -3 mRNA expression during fasting in obese and lean humans." *J Clin Invest* **100**(11): 2665-70.
- Miroux, B., V. Frossard, et al. (1993). "The topology of the brown adipose tissue mitochondrial uncoupling protein determined with antibodies against its antigenic sites revealed by a library of fusion proteins." *Embo J* **12**(10): 3739-45.
- Mitchell, P. (1979). "Keilin's respiratory chain concept and its chemiosmotic consequences." *Science* **206**(4423): 1148-59.
- Modriansky, M., D. L. Murdza-Inglis, et al. (1997). "Identification by site-directed mutagenesis of three arginines in uncoupling protein that are essential for nucleotide binding and inhibition." *J Biol Chem* **272**(40): 24759-62.
- Mojena, M., M. L. Marcos, et al. (1989). "Effect of sulfonylureas on hepatic glycogen metabolism: activation of glycogen phosphorylase." *Metabolism* **38**(5): 466-70.
- Monge, L., M. Mojena, et al. (1986). "Chlorpropamide raises fructose-2,6-bisphosphate concentration and inhibits gluconeogenesis in isolated rat hepatocytes." *Diabetes* **35**(1): 89-96.
- Mori, H., H. Okazawa, et al. (2001). "A polymorphism in the 5' untranslated region and a Met229-->Leu variant in exon 5 of the human UCP1 gene are associated with susceptibility to type II diabetes mellitus." *Diabetologia* **44**(3): 373-6.
- Mori, S., N. Yoshizuka, et al. (2008). "Expression of uncoupling proteins in human skin and skin-derived cells." *J Invest Dermatol* **128**(8): 1894-900.
- Moynihan, K. A., A. A. Grimm, et al. (2005). "Increased dosage of mammalian Sir2 in pancreatic beta cells enhances glucose-stimulated insulin secretion in mice." *Cell Metab* **2**(2): 105-17.
- Murayama, S. and H. Handa (2000). "Isolation and characterization of cDNAs encoding mitochondrial uncoupling proteins in wheat: wheat UCP genes are not regulated by low temperature." *Mol Gen Genet* **264**(1-2): 112-8.
- Nabben, M., J. Hoeks, et al. (2008). "The effect of UCP3 overexpression on mitochondrial ROS production in skeletal muscle of young versus aged mice." *FEBS Lett* **582**(30): 4147-52.
- Nakatani, T., N. Tsuboyama-Kasaoka, et al. (2002). "Mechanism for peroxisome proliferator-activated receptor-alpha activator-induced up-regulation of UCP2 mRNA in rodent hepatocytes." *J Biol Chem* **277**(11): 9562-9.

- Nakazaki, M., M. Kakei, et al. (2002). "Association of upregulated activity of K(ATP) channels with impaired insulin secretion in UCP1-expressing insulinoma cells." J Physiol **540**(Pt 3): 781-9.
- Nantes, I. L., M. M. Fagian, et al. (1999). "Low temperature and aging-promoted expression of PUMP in potato tuber mitochondria." FEBS Lett **457**(1): 103-6.
- Nedergaard, J., V. Golozoubova, et al. (2001). "Life without UCP1: mitochondrial, cellular and organismal characteristics of the UCP1-ablated mice." Biochem Soc Trans **29**(Pt 6): 756-63.
- Negre-Salvayre, A., C. Hirtz, et al. (1997). "A role for uncoupling protein-2 as a regulator of mitochondrial hydrogen peroxide generation." Faseb J **11**(10): 809-15.
- Nibbelink, M., K. Moulin, et al. (2001). "Brown fat UCP1 is specifically expressed in uterine longitudinal smooth muscle cells." J Biol Chem **276**(50): 47291-5.
- Nicholls, D. G. (1976). "Hamster brown-adipose-tissue mitochondria. Purine nucleotide control of the ion conductance of the inner membrane, the nature of the nucleotide binding site." Eur J Biochem **62**(2): 223-8.
- Nicholls, D. G., H. J. Grav, et al. (1972). "Mitochondrial from hamster brown-adipose tissue. Regulation of respiration in vitro by variations in volume of the matrix compartment." Eur J Biochem **31**(3): 526-33.
- Nieters, A., N. Becker, et al. (2002). "Polymorphisms in candidate obesity genes and their interaction with dietary intake of n-6 polyunsaturated fatty acids affect obesity risk in a sub-sample of the EPIC-Heidelberg cohort." Eur J Nutr **41**(5): 210-21.
- Nubel, T. and D. Ricquier (2006). "Respiration under control of uncoupling proteins: Clinical perspective." Horm Res **65**(6): 300-10.
- Ochoa, M. C., J. L. Santos, et al. (2007). "Association between obesity and insulin resistance with UCP2-UCP3 gene variants in Spanish children and adolescents." Mol Genet Metab **92**(4): 351-8.
- Otabe, S., K. Clement, et al. (2000). "A genetic variation in the 5' flanking region of the UCP3 gene is associated with body mass index in humans in interaction with physical activity." Diabetologia **43**(2): 245-9.
- Pastore, D., A. Fratianni, et al. (2000). "Effects of fatty acids, nucleotides and reactive oxygen species on durum wheat mitochondria." FEBS Lett **470**(1): 88-92.
- Paulik, M. A., R. G. Buckholz, et al. (1998). "Development of infrared imaging to measure thermogenesis in cell culture: thermogenic effects of uncoupling protein-2, troglitazone, and beta-adrenoceptor agonists." Pharm Res **15**(6): 944-9.
- Pecqueur, C., C. Alves-Guerra, et al. (2009). "UCP2, a metabolic sensor coupling glucose oxidation to mitochondrial metabolism?" IUBMB Life **61**(7): 762-7.
- Pecqueur, C., M. C. Alves-Guerra, et al. (2001). "Uncoupling protein 2, in vivo distribution, induction upon oxidative stress, and evidence for translational regulation." J Biol Chem **276**(12): 8705-12.
- Pecqueur, C., A. M. Cassard-Doulcier, et al. (1999). "Functional organization of the human uncoupling protein-2 gene, and juxtaposition to the uncoupling protein-3 gene." Biochem Biophys Res Commun **255**(1): 40-6.
- Pecqueur, C., E. Couplan, et al. (2001). "Genetic and physiological analysis of the role of uncoupling proteins in human energy homeostasis." J Mol Med **79**(1): 48-56.
- Pilkis, S. J. and T. H. Claus (1991). "Hepatic gluconeogenesis/glycolysis: regulation and structure/function relationships of substrate cycle enzymes." Annu Rev Nutr **11**: 465-515.
- Produit-Zengaffinen, N., N. Davis-Lameloise, et al. (2007). "Increasing uncoupling protein-2 in pancreatic beta cells does not alter glucose-induced insulin

- secretion but decreases production of reactive oxygen species." Diabetologia **50**(1): 84-93.
- Rabelo, R., C. Reyes, et al. (1996). "A complex retinoic acid response element in the uncoupling protein gene defines a novel role for retinoids in thermogenesis." Endocrinology **137**(8): 3488-96.
- Rabelo, R., A. Schiffman, et al. (1995). "Delineation of thyroid hormone-responsive sequences within a critical enhancer in the rat uncoupling protein gene." Endocrinology **136**(3): 1003-13.
- Rial, E. and M. M. Gonzalez-Barroso (2001). "Physiological regulation of the transport activity in the uncoupling proteins UCP1 and UCP2." Biochim Biophys Acta **1504**(1): 70-81.
- Ricquier, D. (1999). "Uncoupling protein-2 (UCP2): molecular and genetic studies." Int J Obes Relat Metab Disord **23 Suppl 6**: S38-42.
- Ricquier, D. and F. Bouillaud (2000). "Mitochondrial uncoupling proteins: from mitochondria to the regulation of energy balance." J Physiol **529 Pt 1**: 3-10.
- Ricquier, D. and F. Bouillaud (2000). "The uncoupling protein homologues: UCP1, UCP2, UCP3, StUCP and AtUCP." Biochem J **345 Pt 2**: 161-79.
- Ricquier, D., L. Casteilla, et al. (1991). "Molecular studies of the uncoupling protein." Faseb J **5**(9): 2237-42.
- Ricquier, D., C. Lin, et al. (1982). "Isolation of the GDP binding protein from brown adipose tissue mitochondria of several animals and amino acid composition study in rat." Biochem Biophys Res Commun **106**(2): 582-9.
- Ruzicka, M., E. Skobisova, et al. (2005). "Recruitment of mitochondrial uncoupling protein UCP2 after lipopolysaccharide induction." Int J Biochem Cell Biol **37**(4): 809-21.
- Saleh, M. C., M. B. Wheeler, et al. (2002). "Uncoupling protein-2: evidence for its function as a metabolic regulator." Diabetologia **45**(2): 174-87.
- Samec, S., J. Seydoux, et al. (1999). "Post-starvation gene expression of skeletal muscle uncoupling protein 2 and uncoupling protein 3 in response to dietary fat levels and fatty acid composition: a link with insulin resistance." Diabetes **48**(2): 436-41.
- Sanchis, D., C. Fleury, et al. (1998). "BMCP1, a novel mitochondrial carrier with high expression in the central nervous system of humans and rodents, and respiration uncoupling activity in recombinant yeast." J Biol Chem **273**(51): 34611-5.
- Scaduto, R. C., Jr. and L. W. Grotyohann (1999). "Measurement of mitochondrial membrane potential using fluorescent rhodamine derivatives." Biophys J **76**(1 Pt 1): 469-77.
- Schaffler, A., K. D. Palitzsch, et al. (1999). "Frequency and significance of the A-->G (-3826) polymorphism in the promoter of the gene for uncoupling protein-1 with regard to metabolic parameters and adipocyte transcription factor binding in a large population-based Caucasian cohort." Eur J Clin Invest **29**(9): 770-9.
- Schrauwen, P., H. Hoppeler, et al. (2001). "Fiber type dependent upregulation of human skeletal muscle UCP2 and UCP3 mRNA expression by high-fat diet." Int J Obes Relat Metab Disord **25**(4): 449-56.
- Schrauwen, P., F. J. Troost, et al. (1999). "Skeletal muscle UCP2 and UCP3 expression in trained and untrained male subjects." Int J Obes Relat Metab Disord **23**(9): 966-72.
- Schrauwen, P., J. Xia, et al. (1999). "Skeletal muscle uncoupling protein 3 expression is a determinant of energy expenditure in Pima Indians." Diabetes **48**(1): 146-9.
- Sears, I. B., M. A. MacGinnitie, et al. (1996). "Differentiation-dependent expression of the brown adipocyte uncoupling protein gene: regulation by peroxisome proliferator-activated receptor gamma." Mol Cell Biol **16**(7): 3410-9.

- Shang, Y., Y. Liu, et al. (2009). "Targeted expression of uncoupling protein 2 to mouse liver increases the susceptibility to lipopolysaccharide/galactosamine-induced acute liver injury." Hepatology **50**(4): 1204-16.
- Shimokawa, T., M. Kato, et al. (1998). "In vivo effects of pioglitazone on uncoupling protein-2 and -3 mRNA levels in skeletal muscle of hyperglycemic KK mice." Biochem Biophys Res Commun **251**(1): 374-8.
- Shin, H. D., K. S. Kim, et al. (2005). "The effects of UCP-1 polymorphisms on obesity phenotypes among Korean female subjects." Biochem Biophys Res Commun **335**(2): 624-30.
- Short, M. K., D. E. Clouthier, et al. (1992). "Tissue-specific, developmental, hormonal, and dietary regulation of rat phosphoenolpyruvate carboxykinase-human growth hormone fusion genes in transgenic mice." Mol Cell Biol **12**(3): 1007-20.
- Simoneau, J. A., D. E. Kelley, et al. (1998). "Overexpression of muscle uncoupling protein 2 content in human obesity associates with reduced skeletal muscle lipid utilization." Faseb J **12**(15): 1739-45.
- Sivitz, W. I., B. D. Fink, et al. (1999). "Fasting and leptin modulate adipose and muscle uncoupling protein: divergent effects between messenger ribonucleic acid and protein expression." Endocrinology **140**(4): 1511-9.
- Skarka, L., K. Bardova, et al. (2003). "Expression of mitochondrial uncoupling protein 3 and adenine nucleotide translocase 1 genes in developing rat heart: putative involvement in control of mitochondrial membrane potential." J Mol Cell Cardiol **35**(3): 321-30.
- Smorodchenko, A., A. Rupprecht, et al. (2009). "Comparative analysis of uncoupling protein 4 distribution in various tissues under physiological conditions and during development." Biochim Biophys Acta **1788**(10): 2309-19.
- Solanes, G., N. Pedraza, et al. (2005). "Thyroid hormones directly activate the expression of the human and mouse uncoupling protein-3 genes through a thyroid response element in the proximal promoter region." Biochem J **386**(Pt 3): 505-13.
- Solanes, G., A. Vidal-Puig, et al. (1997). "The human uncoupling protein-3 gene. Genomic structure, chromosomal localization, and genetic basis for short and long form transcripts." J Biol Chem **272**(41): 25433-6.
- Son, C., K. Hosoda, et al. (2004). "Reduction of diet-induced obesity in transgenic mice overexpressing uncoupling protein 3 in skeletal muscle." Diabetologia **47**(1): 47-54.
- Soumano, K., S. Desbiens, et al. (2000). "Glucocorticoids inhibit the transcriptional response of the uncoupling protein-1 gene to adrenergic stimulation in a brown adipose cell line." Mol Cell Endocrinol **165**(1-2): 7-15.
- Sramkova, D., S. Krejbichova, et al. (2007). "The UCP1 gene polymorphism A-3826G in relation to DM2 and body composition in Czech population." Exp Clin Endocrinol Diabetes **115**(5): 303-7.
- Stuart, J. A., S. Cadenas, et al. (2001). "Mitochondrial proton leak and the uncoupling protein 1 homologues." Biochim Biophys Acta **1504**(1): 144-58.
- Stuart, J. A., J. A. Harper, et al. (2001). "A mitochondrial uncoupling artifact can be caused by expression of uncoupling protein 1 in yeast." Biochem J **356**(Pt 3): 779-89.
- Stuart, J. A., J. A. Harper, et al. (2001). "Physiological levels of mammalian uncoupling protein 2 do not uncouple yeast mitochondria." J Biol Chem **276**(21): 18633-9.
- Sun, X., C. Wray, et al. (2003). "Expression of uncoupling protein 3 is upregulated in skeletal muscle during sepsis." Am J Physiol Endocrinol Metab **285**(3): E512-20.
- Surwit, R. S., C. M. Kuhn, et al. (1988). "Diet-induced type II diabetes in C57BL/6J mice." Diabetes **37**(9): 1163-7.

- Surwit, R. S., M. F. Seldin, et al. (1991). "Control of expression of insulin resistance and hyperglycemia by different genetic factors in diabetic C57BL/6J mice." Diabetes **40**(1): 82-7.
- Surwit, R. S., S. Wang, et al. (1998). "Diet-induced changes in uncoupling proteins in obesity-prone and obesity-resistant strains of mice." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(7): 4061-5.
- Takahashi, A., K. Motomura, et al. (2005). "Transgenic mice overexpressing nuclear SREBP-1c in pancreatic beta-cells." Diabetes **54**(2): 492-9.
- Tiraby, C., G. Tavernier, et al. (2007). "Resistance to high-fat-diet-induced obesity and sexual dimorphism in the metabolic responses of transgenic mice with moderate uncoupling protein 3 overexpression in glycolytic skeletal muscles." Diabetologia **50**(10): 2190-9.
- Tomas, P., J. Jimenez-Jimenez, et al. (2004). "Activation by retinoids of the uncoupling protein UCP1." Biochim Biophys Acta **1658**(1-2): 157-64.
- Torczynski, R. M., M. Fuke, et al. (1985). "Cloning and sequencing of a human 18S ribosomal RNA gene." DNA **4**(4): 283-91.
- Tsuboyama-Kasaoka, N., N. Tsunoda, et al. (1999). "Overexpression of GLUT4 in mice causes up-regulation of UCP3 mRNA in skeletal muscle." Biochem Biophys Res Commun **258**(1): 187-93.
- Tsuboyama-Kasaoka, N., N. Tsunoda, et al. (1998). "Up-regulation of uncoupling protein 3 (UCP3) mRNA by exercise training and down-regulation of UCP3 by denervation in skeletal muscles." Biochem Biophys Res Commun **247**(2): 498-503.
- Van Aken, O., B. Zhang, et al. (2009). "Defining the mitochondrial stress response in *Arabidopsis thaliana*." Mol Plant **2**(6): 1310-24.
- Van Remmen, H. and W. F. Ward (1998). "Effect of dietary restriction on hepatic and renal phosphoenolpyruvate carboxykinase induction in young and old Fischer 344 rats." Mech Ageing Dev **104**(3): 263-75.
- Vidal-Puig, A., G. Solanes, et al. (1997). "UCP3: an uncoupling protein homologue expressed preferentially and abundantly in skeletal muscle and brown adipose tissue." Biochem Biophys Res Commun **235**(1): 79-82.
- Vidal-Puig, A. J., D. Grujic, et al. (2000). "Energy metabolism in uncoupling protein 3 gene knockout mice." J Biol Chem **275**(21): 16258-66.
- Vidal, H., D. Langin, et al. (1999). "Lack of skeletal muscle uncoupling protein 2 and 3 mRNA induction during fasting in type-2 diabetic subjects." Am J Physiol **277**(5 Pt 1): E830-7.
- Villarroya, F., S. Brun, et al. (2001). "Gene expression of leptin and uncoupling proteins: molecular end-points of fetal development." Biochem Soc Trans **29**(Pt 2): 76-80.
- Villarroya, F., R. Iglesias, et al. (2007). "PPARs in the Control of Uncoupling Proteins Gene Expression." PPAR Res **2007**: 74364.
- von Ballmoos, C., A. Wiedenmann, et al. (2009). "Essentials for ATP synthesis by F1F0 ATP synthases." Annu Rev Biochem **78**: 649-72.
- Walder, K., R. A. Norman, et al. (1998). "Association between uncoupling protein polymorphisms (UCP2-UCP3) and energy metabolism/obesity in Pima indians." Hum Mol Genet **7**(9): 1431-5.
- Warden, C. (1999). "Genetics of uncoupling proteins in humans." Int J Obes Relat Metab Disord **23 Suppl 6**: S46-8.
- Watanabe, A. and A. Hirai (2002). "Two uncoupling protein genes of rice (*Oryza sativa* L.): molecular study reveals the defects in the pre-mRNA processing for the heat-generating proteins of the subtropical cereal." Planta **215**(1): 90-100.

- Watanabe, A., M. Nakazono, et al. (1999). "AtUCP2: a novel isoform of the mitochondrial uncoupling protein of *Arabidopsis thaliana*." Plant Cell Physiol **40**(11): 1160-6.
- Watanabe, M., T. Yamamoto, et al. (2008). "Cold-induced changes in gene expression in brown adipose tissue: implications for the activation of thermogenesis." Biol Pharm Bull **31**(5): 775-84.
- Watson, P. M., S. P. Commins, et al. (2000). "Differential regulation of leptin expression and function in A/J vs. C57BL/6J mice during diet-induced obesity." Am J Physiol Endocrinol Metab **279**(2): E356-65.
- Weigle, D. S. and B. E. Levin (2000). "Defective dietary induction of uncoupling protein 3 in skeletal muscle of obesity-prone rats." Obes Res **8**(5): 385-91.
- Weigle, D. S., L. E. Selfridge, et al. (1998). "Elevated free fatty acids induce uncoupling protein 3 expression in muscle: a potential explanation for the effect of fasting." Diabetes **47**(2): 298-302.
- Wolf, G. (2009). "Brown adipose tissue: the molecular mechanism of its formation." Nutr Rev **67**(3): 167-71.
- Yamada, M., T. Hashida, et al. (1998). "Genomic organization and promoter function of the mouse uncoupling protein 2 (UCP2) gene." FEBS Lett **432**(1-2): 65-9.
- Yanagisawa, Y., K. Hasegawa, et al. (2001). "Uncoupling protein 3 and peroxisome proliferator-activated receptor gamma2 contribute to obesity and diabetes in palauans." Biochem Biophys Res Commun **281**(3): 772-8.
- Yu, X. X., W. Mao, et al. (2000). "Characterization of novel UCP5/BMCP1 isoforms and differential regulation of UCP4 and UCP5 expression through dietary or temperature manipulation." Faseb J **14**(11): 1611-8.
- Yubero, P., M. J. Barbera, et al. (1998). "Dominant negative regulation by c-Jun of transcription of the uncoupling protein-1 gene through a proximal cAMP-regulatory element: a mechanism for repressing basal and norepinephrine-induced expression of the gene before brown adipocyte differentiation." Mol Endocrinol **12**(7): 1023-37.
- Yubero, P., C. Manchado, et al. (1994). "CCAAT/enhancer binding proteins alpha and beta are transcriptional activators of the brown fat uncoupling protein gene promoter." Biochem Biophys Res Commun **198**(2): 653-9.
- Yubero, P., O. Vinas, et al. (1994). "Identification of tissue-specific protein binding domains in the 5'-proximal regulatory region of the rat mitochondrial brown fat uncoupling protein gene." Biochem Biophys Res Commun **204**(2): 867-73.
- Zhang, C. Y., G. Baffy, et al. (2001). "Uncoupling protein-2 negatively regulates insulin secretion and is a major link between obesity, beta cell dysfunction, and type 2 diabetes." Cell **105**(6): 745-55.
- Zhang, C. Y., T. Hagen, et al. (1999). "Assessment of uncoupling activity of uncoupling protein 3 using a yeast heterologous expression system." FEBS Lett **449**(2-3): 129-34.